



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Numéro de publication :

0 169 112  
B1

(12)

## FASCICULE DE BREVET EUROPÉEN

- (45) Date de publication du fascicule du brevet :  
26.04.89  
(21) Numéro de dépôt : 85401200.2  
(22) Date de dépôt : 18.06.88

(51) Int. Cl. : C 07 D233/60, C 07 D401/12,  
C 07 D403/12, A 61 K 31/415

(54) Imidazolides, procédé d'obtention et application à titre d'intermédiaires de synthèse de conjugués cytotoxiques.

- (30) Priorité : 20.06.84 FR 8409703  
20.06.84 FR 8409704  
(43) Date de publication de la demande :  
22.01.88 Bulletin 88/04  
(45) Mention de la délivrance du brevet :  
26.04.89 Bulletin 89/17  
(84) Etats contractants désignés :  
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE  
(56) Documents cités :  
Arch. Biochem. Biophys. 1959, 82, 70,77  
J. Amer. Chem. Soc. 1970, 92, 76, 29-31  
CA90:164345a

- (73) Titulaire : SANOFI  
40, Avenue George V  
F-75008 Paris (FR)  
(72) Inventeur : Jansen, Franz K.  
Chemin des Fresquets Assas  
F-34100 Castres (FR)  
Inventeur : Gras, Pierre  
18 rue des Muriers  
F-34100 Montpellier (FR)  
(74) Mandataire : Gillard, Marie-Louise et al  
Cabinet Beau de Loménie 55, Rue d'Amsterdam  
F-75008 Paris (FR)

EP 0 169 112 B1

Il est rappelé que : Dans un délai de neuf mois à compter de la date de publication de la mention de la délivrance du brevet européen toute personne peut faire opposition au brevet européen délivré, auprès de l'Office européen des brevets. L'opposition doit être formée par écrit et motivée. Elle n'est réputée formée qu'après paiement de la taxe d'opposition (Art. 99(1) Convention sur le brevet européen).

## Description

La présente invention concerne des nouveaux imidazolides et un procédé pour leur obtention. Les imidazolides selon l'invention conviennent notamment comme agents de couplage de protéines, en particulier pour la synthèse de conjugués cytotoxiques utilisables en thérapeutique.

Les composés selon l'invention répondent à la formule :

5



10 dans laquelle :

E représente un groupe  $-(CH_2)_p-$ , où p est un nombre entier de 2 à 7 ou un groupe :

15



et G est un groupement de structure  $-S-S-X$ , où X est un radical activateur choisi parmi les groupes 2-pyridyle et 4-pyridyle non substitués ou substitués par un ou des halogènes ou des radicaux alkyle, carboxyle, alkoxy-carboxyle, le groupe phényle non substitué ou substitué par un ou des halogènes ou 20 des groupes nitro, alkoxy, carboxyle ou alkoxy-carboxyle, ou un groupe alkoxy-carboxyle.

Les termes « alkyle » et « alkoxy » désignent des groupes contenant jusqu'à 5 atomes de carbone.

Les nouveaux composés de formule I sont préparés par le procédé qui consiste à faire réagir un composé de formule :

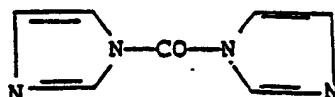
25



(II)

dans laquelle G et E sont tels que définis ci-dessus, avec le carbonyldiimidazole de formule :

30



35 dans un solvant organique, à la température de 10 à 40 °C. Les solvants étherés, tels que le dioxane et le tétrahydrofurane sont particulièrement préférés.

Les composés de formule I sont particulièrement utiles comme agents de couplage sur les hydroxyles des tyrosines de protéines, telles que les protéines A et P, définies ci-après pour l'obtention des conjugués ou immuno-toxines qui font l'objet de la demande de brevet français déposée ce jour au nom de la demanderesse et intitulée « nouveaux conjugués cytotoxiques utilisables en thérapeutique et 40 procédé d'obtention ».

Ces immunotoxines répondent à la formule statistique suivante :



45 dans laquelle P' représente le radical d'une protéine P qui est un anticorps ou un fragment d'anticorps tel quel ou chimiquement convenablement modifié, privé d'une ou plusieurs fonctions propres et dans lequel les autres groupes fonctionnels sont éventuellement bloqués, A' représente le radical d'une protéine qui est la sous-unité A de la ricine telle quelle ou chimiquement convenablement modifiée, privée d'au moins une de ses fonctions propres et dans lequel les autres groupes fonctionnels sont

50 éventuellement bloqués et W représente une structure covalente bivalente contenant un groupe disulfure dont les atomes de soufre sont soit ceux des cystéines de P et A, soit sont liés aux fonctions propres de P et/ou de A par des structures d'espacement portant un groupe fonctionnel lié auxdites fonctions propres de P et/ou de A ; avec la limitation que, lorsqu'un des atomes de soufre dudit disulfure est celui de l'une des cystéines de A, l'autre soufre est lié à la protéine P par une structure d'espacement portant un groupe fonctionnel lié à une fonction de la protéine P autre qu'une fonction amine.

55 Les immunotoxines préférées répondent à la formule statistique :



60 dans laquelle P' et A' sont tels que définis ci-dessus et W' représente une structure covalente choisie parmi :

(a) un groupement de formule



(b) un groupement de formule

5



où

10  $Z$  et  $Z'$  représentent les fonctions propres des protéines A et P, choisies parmi l'atome d'oxygène provenant de l'hydroxyle de l'un des résidus de tyrosine ; le groupe carbonyle provenant de l'un des carboxyles terminaux ou des carboxyles libres des acides aspartiques et/ou glutamiques de A et de P ; le groupe provenant de la structure dialdéhydique obtenue après oxydation de la structure glucidique de P par l'acide périodique ; et le groupe  $\text{---NH}$  provenant de l'une des amines terminales de A et de P ou de l'une des amines en position epsilon de l'un des résidus de tyrosine ;

15  $Z'$  est tel que défini ci-dessus pour  $Z$  et  $Z'$  mais ne peut pas être  $\text{---NH}$  ;

$Y$  et  $Y'$  représentent des groupes fonctionnels capables de se lier d'une façon covalente avec l'une quelconque des fonctions  $Z$ ,  $Z'$  et  $Z''$  des protéines A et P ;

16  $E$  et  $E'$  représentent des structures d'espacement inertes ; et  
n représente zéro ou 1.

20 Les immunotoxines ci-dessus sont représentées par les formules IV et V en forme simplifiée, mais il est entendu que la structure covalente bivalente  $\text{---W---}$  ou  $\text{---W'---}$  est liée à au moins une molécule P et à au moins une molécule A. Le nombre de liaisons avec les protéines P et A dépend du nombre des fonctions propres desdites protéines intervenant dans l'opération de couplage.

25 Par exemple, si une immunotoxine est formée par couplage de la sous-unité A de la ricine native avec l'anticorps P (par exemple l'anticorps T101) par l'intermédiaire d'une structure covalente bivalente ayant un groupe disulfure dont un soufre est celui de la cystéine 257 de la chaîne A de la ricine et l'autre est lié aux oxygènes phénoliques des tyrosines de l'anticorps P par un groupe oxopropylque, elle aura la formule statistique

30



dans laquelle  $t$  représente le nombre des tyrosines de l'anticorps (par exemple de l'anticorps T101) intervenues dans le couplage.

L'immunotoxine ainsi obtenue correspond ainsi à un produit de formule V, où :

35  $P'$  est tel que défini ci-dessus, notamment le radical de l'anticorps T101 privé de  $t$  fonctions phénoliques de ses tyrosines ;

$A'$  est tel que défini ci-dessus, notamment le radical de la chaîne A de la ricine privée de la fonction thiol de sa cystéine 257 ;

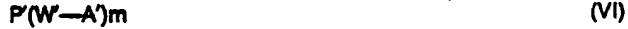
W est le groupement (c) :

40



où  $Z'$  est l'oxygène des hydroxydes phénoliques intervenus dans le couplage,  $Y$  est  $\text{---CO---}$  ;  $E$  est la structure d'espacement inerte  $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---}$  et  $n$  est zéro.

45 Particulièrement préférées sont les immunotoxines formées par une ou plusieurs structures contenant la sous-unité A de la ricine et un seul anticorps P, représentées par la formule statistique



50 dans laquelle  $P'$ ,  $W$  et  $A'$  sont tels que définis ci-dessus et  $m$  représente le nombre de fonctions propres de la protéine P intervenues dans le couplage. Le nombre  $m$  varie de 0,3 à 12, de préférence de 0,5 à 10.

L'expression «  $m$  varie de 0,3 à 12, de préférence de 0,5 à 10 » signifie que la valeur de  $m$  est statistique car dans la population des molécules d'anticorps le couplage ne se produit pas d'une façon homogène. Le nombre  $m$  peut donc ne pas être entier.

55 La valeur de  $m$  dépend notamment des anticorps utilisés, plus particulièrement de leur poids moléculaire.

Ainsi, si comme anticorps P de départ on utilise un fragment Fab ou Fab', la valeur de  $m$  pourra varier entre 0,3 et environ 2 ; si l'on utilise un fragment F(ab')<sub>2</sub>,  $m$  pourra varier entre 0,5 et environ 4 ; pour un anticorps du type IgG, la valeur de  $m$  sera entre 0,5 et 6 ; enfin, pour un anticorps IgM, la valeur de  $m$  pourra varier entre 1 et 12.

Il est cependant préférable que le degré de substitution sur l'anticorps P soit  $t$  telle qu'il conduise à une valeur de  $m$  non inférieure à 0,5 et non supérieure à 10.

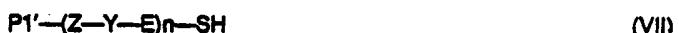
Plus généralement, les structures IV et V ci-dessus représentent des formules statistiques écrites de façon simplifiée, comme il a été spécifié ci-dessus.

65 D'une façon analogue, les formules VII, VIII et XII ci-dessous sont également statistiques — lorsque, l

cas échéant, n est 1 — car les réactifs de couplage sont préparés à partir de populations de protéines P1 et P2 qui ont toutes exactement les mêmes propriétés que celles prises en compte ci-dessus pour l'anticorps P, qu'ces protéines P1 et P2 soient elles-mêmes l'anticorps P ou la chaîne A de la ricin.

- Les immunotoxines ayant la structure IV ci-dessus peuvent être obtenues par le procédé qui consiste à faire réagir en solution aqueuse et à la température ambiante une protéine P1, qui est indifféremment soit la sous-unité A de la ricine éventuellement modifiée soit un anticorps ou fragment d'anticorps, porteuse d'au moins un groupe thiol libre attaché à ladite protéine P1 directement ou par l'intermédiaire d'une structure d'espacement, avec une protéine P2, différente de P1, qui est indifféremment soit la sous-unité A de la ricine soit un anticorps ou fragment d'anticorps, porteuse d'un groupement capable de couplage avec le thiol libre de la protéine P1, de façon à former une liaison thioéther ou disulfure ; avec la limitation que, dans le cas de la formation de la liaison disulfure, lorsque la protéine P1 est la sous-unité A de la ricine, la liaison avec la protéine P2 est effectuée sur une fonction de ladite protéine P2 autre que les fonctions amine.

- Selon un aspect préférentiel, le procédé pour la préparation d'une immunotoxine ayant la structure V, dans laquelle P', W' et A' sont tels que définis ci-dessus, consiste à faire réagir en solution aqueuse et à la température ambiante une protéine de formule



- 20 avec une protéine de formule statistique



- où P1' et P2' représentent les radicaux des protéines P1 et P2 liés aux fonctions propres desdites protéines ou les radicaux des protéines P1 et P2 provenant de l'ouverture des structures glucidiques par action de l'acide périodique. Z, Z', Y, Y', E et E' sont tels que définis ci-dessus et G représente un groupe  $-S-S-X$ , où X est un groupe activateur, étant entendu que lorsque P1' est la sous-unité A de la ricine, n est 1 ou bien n peut être zéro, mais, dans ce cas, Z est autre que  $-NH-$ .

- Autant P que A sont donc des protéines qui présentent indifféremment  
 30 (1) la ou les fonctions thiol qui participent au couplage et  
 (2) un ou plusieurs groupements fonctionnels capables de réagir avec les fonctions thiol ci-dessus pour former une liaison disulfure.

- Dans la présente description, lesdites fonctions thiol et groupements fonctionnels sont ceux des protéines P ou A natives, ou bien ils y sont introduits artificiellement.

- 35 Pour des raisons de clarté on précise ci-après la signification des symboles utilisés pour désigner les protéines ci-dessus ou leurs radicaux et des expressions utilisées pour désigner les différents symboles.

- Le symbole P représente une protéine choisie parmi tout anticorps ou fragment d'anticorps, ou toute immunoglobuline ou fragment d'immunoglobuline ou toute molécule dérivant des précédentes par modification artificielle de l'un quelconque de leurs groupements fonctionnels, y compris des structures glucidiques qu'elles portent, sous réserve que la protéine ainsi choisie reste capable de reconnaître sélectivement un antigène donné à la surface des cellules porteuses de cet antigène et notamment des cellules cancéreuses.

- 40 Le symbole A représente une protéine qui est la sous-unité dite chaîne A de la toxine végétale ricine telle qu'elle peut être directement obtenue à partir de la ricine naturelle ou toute molécule dérivant de cette chaîne A par modification artificielle de tout groupement fonctionnel porté par cette protéine sous réserve que la protéine ainsi choisie présente encore la propriété d'inhiber la synthèse protéique ribosomale des cellules eucaryotes telle que l'on peut la mettre en évidence dans un modèle d'étude acellulaire.

- 45 Le symbole P' représente un radical dérivé de la protéine P ci-dessus telle quelle ou chimiquement convenablement modifiée, privée d'une ou plusieurs fonctions propres et dont d'autres groupes fonctionnels sont éventuellement bloqués.

- 50 Le symbole A' représente un radical dérivé de la protéine A ci-dessus telle quelle ou chimiquement convenablement modifiée, privée d'une ou plusieurs fonctions propres et dont d'autres groupes fonctionnels sont éventuellement bloqués.

- 55 Le symbole P1 représente une des protéines A et P telles que définies ci-dessus qui porte des fonctions thiol libres, attachées à ladite protéine directement ou par l'intermédiaire d'une structure d'espacement.

- Le symbole P2, différent de P1, représente une des protéines A et P telles que définies ci-dessus, qui porte un ou plusieurs groupements fonctionnels capables de réagir avec les thiols libres.

- 60 Le symbole P1' représente le radical de la protéine P1 lié aux fonctions propres de la protéine P1 notamment les fonctions SH (de la cystéine), NH<sub>2</sub> (terminal de la protéine ou dans la position epsilon des lysines), OH (des tyrosines), COOH (des acides aspartiques et glutamiques) ou l'radical de la protéine P1, provenant de l'ouverture des structures glucidiques par action de l'acide périodique lorsque P1 désigne un anticorps ou fragment d'anticorps.

- 65 Le symbole P2' représente le radical de la protéine P2 lié aux groupes fonctionnels caractéristiques

NH<sub>2</sub> (terminal de la protéine ou dans la position epsilon des lysines), OH (des tyrosines), COOH (des acides aspartiques et glutamiques).

Par exemple, P1'-SH représente la protéine P1 (qui peut être indifféremment l'anticorps ou fragment d'anticorps P ou la sous-unité A de la racine) dans laquelle les groupes SH des cystéines sont libres et les autres groupes fonctionnels sont éventuellement bloqués.

De la même façon, P1'-CO— représente la protéine P1, dans laquelle son groupe carboxylique terminal ou les groupes carboxyliques de ses acides glutamiques et aspartiques sont couplés avec un groupement qui apporte un groupe SH introduit artificiellement.

Encore, P2'-NH— représente la protéine P2 (qui peut être indifféremment l'anticorps ou fragment d'anticorps P ou la sous-unité A de la ricine) dans laquelle son groupe amino terminal ou les groupes amino de ses lysines sont attachés à un groupement susceptible de coupleage avec le thiol de la protéine P1.

L'expression « groupe fonctionnel capable de se lier d'une façon covalente » telle qu'utilisée ici pour Y et Y' désigne tous les groupes susceptibles de réagir avec les fonctions propres des protéines P1 et P2 pour donner une liaison covalente. Ainsi, les groupes —CO— et —(C=NH)— sont des groupes fonctionnels convenables susceptibles de se lier aux amines libres, aux thiols et aux hydroxyles phénoliques des protéines. De même, le groupe —NH— est un groupe fonctionnel convenable susceptible de se lier aux groupes carboxyliques libres des protéines. Le groupe =N— est un groupe fonctionnel convenable susceptible de se lier aux deux atomes de carbone des structures glucidiques des protéines P1 ou P2 après oxydation avec les ions periodate lorsque P1 ou P2 désigne un anticorps ou un fragment d'anticorps.

L'expression « fonction propre des protéines » telle qu'utilisée ici pour Z, Z' et Z'' désigne les radicaux provenant des groupes caractéristiques des acides aminés formant les protéines P1 et P2, telles que l'atome d'oxygène provenant des hydroxyles des acides aminés tyrosine et éventuellement sérine, le groupe carbonyle provenant du carboxyle terminal ou des carboxyles libres des acides aspartique et glutamique, le groupe —NH— provenant de l'amino terminale des protéines ou des lysines, l'atome de soufre provenant du thiol de la cystéine. La même expression désigne également le groupe provenant de la structure dialdéhydique obtenue après oxydation de la structure glucidique des protéines P1 ou P2 par traitement avec les ions periodate lorsque P1 ou P2 désigne un anticorps ou fragment d'anticorps.

L'obtention de la chaîne A de ricine pure, nécessaire à la réalisation des immunotoxines définies ci-dessus, a été décrite dans le brevet US 4 340 535. La préparation d'anticorps monoclonaux dirigés contre des cellules cancéreuses humaines a été largement mentionnée dans la littérature scientifique et beaucoup de ces anticorps sont maintenant disponibles commercialement.

Le couplage chimique entre la chaîne A de ricine et l'anticorps (ou fragment d'anticorps) peut être réalisé selon des modes opératoires qui :

préserrent les activités biologiques respectives des deux composants du conjugué : l'anticorps et la chaîne A de ricine,

assurent au procédé une reproductibilité satisfaisante et un bon rendement de couplage, permettent de maîtriser la valeur du rapport chaîne A de ricine/anticorps dans le conjugué obtenu, conduisent à un produit stable et soluble dans l'eau.

Parmi les modes opératoires répondant à ces caractéristiques, il faut privilégier ceux qui mettent en œuvre une ou plusieurs fonctions thiol pour l'établissement de la liaison entre les deux protéines. En effet, ces fonctions thiols se prêtent particulièrement bien à l'établissement de liaisons disulfure qui satisfont aux conditions générales ci-dessus.

D'une façon générale, pour la bonne conduite des réactions de couplage entre protéines et en vue d'éliminer notamment les réticulations anarchiques, il importe que l'une des protéines à coupler et elle seule porte la ou les fonctions thiol à mettre en œuvre, alors que l'autre protéine et elle seule porte une ou plusieurs fonctions susceptibles de réagir avec les thiols en milieu aqueux de pH compris entre 5 et 9 et à une température ne dépassant pas 30 °C, pour fournir une liaison covalente stable et définie.

Les caractéristiques des protéines P1 et P2 utilisées comme produits de départ sont illustrées en détail ci-après. La structure d'espacement E peut être remplacée par les structures préférentielles R à R8 qui ne sont données qu'à titre d'exemple.

#### I — Cas de la protéine P1

Cette protéine étant dans tous les cas celle qui porte la ou les fonctions thiol qui participeront au couplage, la situation se présente de façon diverse selon la nature de cette protéine P1.

A) La protéine P1 porte naturellement un ou plusieurs radicaux thiol utilisables pour permettre le couplage à la protéine P2 : c'est notamment le cas si la protéine P1 est le fragment d'anticorps connu sous le dénomination de F(ab)', tel qu'il est classiquement obtenu par protéolyse limitée de l'anticorps en présence de pepsine, suivie d'une réduction du (ou des) ponts disulfure entre chaînes lourdes.

C'est également le cas si la protéine P1 est la chaîne A de la ricine, ou un dérivé de cette chaîne A où l'un au moins des groupements thiol portés par les résidus de cystéine 171 et 257 de la chaîne A de ricine native est libre et accessible au couplage chimique.

EP 0 169 112 B1

Dans tous ces cas, la protéin P1 porteuse de son (ou ses) groupement(s) thiol naturels peut être utilisée dans cet état pour l'étape de couplage.

B) La protéine P1 ne porte pas naturellement de radicaux thiol utilisables pour permettre le couplage  
5 à la protéine P2 :

— c'est notamment le cas si la protéine P1 est une immunoglobuline native, un anticorps entier ou un fragment d'anticorps et notamment l'un des fragments couramment dénommés F(ab)'2 ou F(ab).

— un autre cas où la protéine P1 ne porte pas naturellement de fonction thiol utilisable pour le couplage est celui où cette protéine P1 est la chaîne A de ricine où chacun des deux résidus de cystéine est soit bloqué par alkylation, soit inaccessible à la modification chimique.

Dans tous les cas, il conviendra alors d'introduire artificiellement sur de telles molécules une ou plusieurs fonctions thiol aptes à permettre le couplage.

Trois types de réaction peuvent être utilisés de préférence pour l'introduction de fonctions thiol :

15 1 — Le premier type de réaction est l'action de l'anhydride S-acétylmercaptopuccinique qui est capable d'acyler des fonctions aminées de la protéine. On pourra ensuite libérer les fonctions thiol par élimination du radical acétyl protecteur, par action de l'hydroxylamine, ainsi que cela a été décrit (Archives of Biochemistry and Biophysics, 119, 41-49, 1967). On pourra même, dans le cas où la (ou les) fonctions(s) thiol ainsi introduites sous forme protégée doivent réagir ultérieurement avec un radical disulfure mixte activé, se dispenser de la déprotection préalable par l'hydroxylamine ; en effet, la réaction de formation de la liaison disulfure utilisant les réactifs objet de la présente invention se produit aussi bien avec le radical S-acétyl qu'avec le thiol libre.

D'autres méthodes décrites dans la littérature scientifique peuvent aussi être utilisées pour l'introduction de fonctions thiol sur la protéine à modifier.

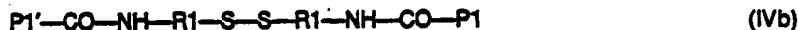
25 2 — Le deuxième type de réaction consiste à faire réagir la protéine par ses groupements carboxyliques avec une molécule diaminée symétrique présentant un pont disulfure, de formule :



30 dans laquelle R1 est un groupe aliphatique comportant de 2 à 5 atomes de carbone.

La réaction se fait de préférence avec la cystamine [ $\text{R}_1 = -(\text{CH}_2)_2-$ ] en présence d'un agent de couplage tel qu'un carbodimide et notamment un dérivé soluble dans l'eau comme l'éthyl-1 (diméthylamino-3 propyl)-3 carbodimide, et conduit à la formation, selon les stoechiométries mises en œuvre, de l'un des dérivés suivants ou du mélange des deux :

35



40 Un tel produit de réaction peut être alors utilisé de deux manières :

a) Si dans les formules Ia ou Ib, la protéine P1 est la chaîne A de ricine ou l'un de ses dérivés le milieu réactionnel obtenu est soumis sans fractionnement à l'action d'un réducteur tel que le mercapto-2-éthanol, ce qui conduit à l'obtention d'un dérivé protéique unique de formule générale :

45



Le produit ainsi obtenu est alors purifié par dialyse ou filtration sur gel.

50 b) Si dans les formules IVa et IVb le radical P1' est le radical de la protéine P1 constituée par un anticorps ou l'un de ses fragments, le milieu réactionnel obtenu sera utilisé tel quel pour le couplage en utilisant alors une méthode d'échange thiol/disulfure par exemple celle décrite par Cilliland et Collier (Cancer Research, 40, 3564, 1980).

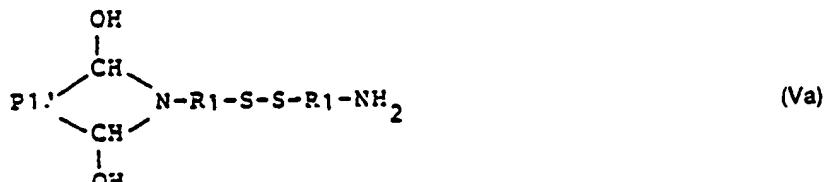
55 3 — Le troisième type de réaction consiste à utiliser des motifs glucidiques naturellement présents sur les anticorps pour fixer le radical porteur du thiol que l'on se propose d'introduire. La protéine est alors soumise à une oxydation par les ions periodate afin de faire apparaître des fonctions aldéhyde sur les motifs glucidiques. Après arrêt de la réaction par addition d'un excès d'éthylène glycol et élimination des sous-produits et excès de réactifs par dialyse, le produit obtenu est traité par une molécule diaminée 60 symétrique présentant un pont disulfure, de formule générale



dans laquelle R1 est un groupe aliphatique comportant de 2 à 5 atomes de carbone. Les produits 65 d'addition formés sont alors réduits en amines secondaires ou tertiaires par action d'un hydrure

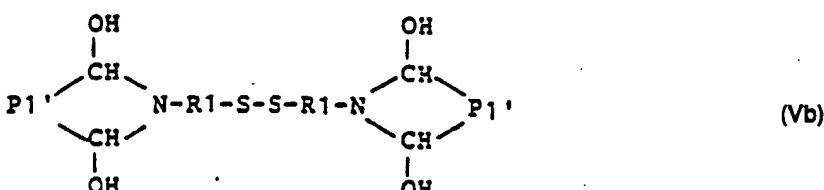
métallique convenable, notamment le borohydru de sodium. La réaction se fait de préférence avec la cystamine [ $R_1 = -(CH_2)_2-$ ] et conduit à la formation, selon les stoechiométries mises en œuvre de l'un des dérivés suivants ou du mélange des deux :

5



10

15



20

25

Le milieu réactionnel obtenu alors peut être traité exactement comme indiqué ci-dessus pour les produits caractérisés par les structures IVa ou IVb où P1' représente un anticorps ou fragment d'anticorps.

Dans les deux derniers types de réaction d'introduction artificielle de groupements thiols décrits ci-dessus (ceux utilisant un réactif disulfure diaminé symétrique), il est préférable que la protéine P1 mise en œuvre ne possède ni groupes SH libres, ni groupes aminés libres.

30

Dans le cas de la chaîne A et de ses dérivés cela peut toujours être réalisé par alkylation du ou des SH naturels obtenue par réaction avec un réactif usuel des thiols tel que le N-éthylmaléimide ou l'acide iodacétique ou l'un de ses dérivés et par méthylation des NH<sub>2</sub> naturels selon le procédé de méthylation réductive décrit par MEANS et FEENEY (Biochemistry 7, 2192 (1968)). On peut introduire ainsi dans la chaîne A de ricine native jusqu'à 6 radicaux méthyle par mole. La protéine ainsi modifiée conserve l'intégralité de ses propriétés biologiques et notamment sa capacité à inhiber la synthèse protéique ribosomale dans les cellules eucaryotes.

35

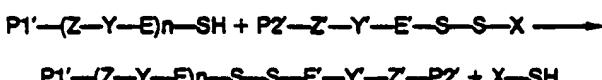
Dans les cas des anticorps ou fragments d'anticorps et plus généralement de toutes les substances du premier groupe tel que défini précédemment qui ne possèdent pas de groupements SH naturellement libres, il conviendra de procéder à une méthylation réductive, par exemple selon la méthode de MEANS et FEENEY : on peut ainsi habituellement introduire plusieurs dizaines de radicaux méthyle par mole d'anticorps sans modifier sa capacité à reconnaître sélectivement un antigène à la surface des cellules porteuses de cet antigène.

## II — Cas de la protéine P2

45

Cette protéine est dans tous les cas celle qui porte un ou plusieurs groupements fonctionnels capables de réagir avec les thiols de la protéine P1 pour former une liaison disulfure. Ces groupements fonctionnels, toujours artificiellement introduits sur la protéine P2 sont choisis comme indiqué ci-après. La préparation du conjugué peut alors être représenté par le schéma :

50



55

La protéine P2 substituée par un atome de soufre actif est obtenue à partir de la protéine P2 elle-même ou de la protéine P2 correctement protégée, par substitution à l'aide d'un réactif lui-même porteur d'un atome de soufre activé selon le schéma :



60

dans lequel :

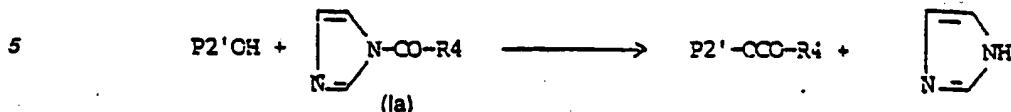
P2 désigne la protéine à substituer

L-Y' représente une fonction permettant la fixation covalente du réactif sur la protéine.

Le groupement fonctionnel L-Y' est une fonction capable de se lier de façon covalente avec l'une quelconque des fonctions portées par les chaînes latérales des aminoacides constitutifs de la protéine à substituer. Parmi celles-ci, on citera notamment les fonctions phénols des radicaux tyrosyle contenus

EP 0 169 112 B1

dans la protéine. Dans ce cas L—Y' pourra notamment représenter un groupement imidazolyl-1-carbonyl, réagissant avec les groupes phénol de la protéin selon la réaction :

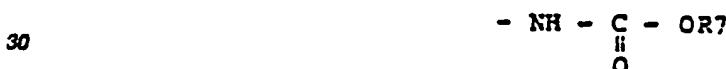


10 où le 1-imidazolylique est L, le groupe CO est Y' et R4 est le groupe —R—S—S—X. Le composé de formule la est un imidazolide selon l'invention. Le radical —S—S—X désigne un disulfure mixte activé capable de réagir avec un radical thiol libre. En particulier, dans ce disulfure mixte, X pourra désigner un groupe pyridyl-2 ou pyridyl-4, éventuellement substitué par un ou des radicaux alkyle, halogène ou carboxylique. X peut aussi désigner un groupe phényle de préférence substitué par un ou des groupes nitro- ou carboxylique. X peut encore représenter un groupe alcoxycarbonyle tel que le groupe méthoxycarbonyle.

15 Le radical R désigne la structure d'espacement (indiquée comme E dans la formule générale II ci-dessus) capable de porter simultanément les substituants Y' et S—S—X. Il devra être choisi de façon à ne pas comporter de fonctions susceptibles d'interférer au cours des réactions ultérieures avec les réactifs utilisés et les produits synthétisés. En particulier, le groupe R peut être un groupe —(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>— avec n compris entre 1 et 10, ou encore un groupe :



25 dans lequel R6 désigne l'hydrogène ou un groupe alkyle ayant de 1 à 8 atomes de carbone et RS désigne un substituant inerte vis-à-vis des réactifs utilisés ultérieurement tel qu'un groupe carbamate

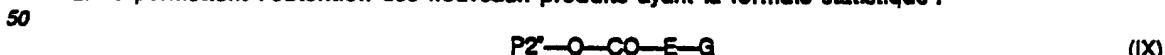


35 où R7 désigne un groupe alkyle droit ou ramifié ayant de 1 à 5 atomes de carbone et notamment le groupe tertiotiobutyle. La réaction du composé L—Y'—R—S—S—X avec la protéine P2 est effectuée en phase liquide homogène le plus souvent dans l'eau ou une solution tampon. Lorsque la solubilité des réactifs l'exige, il est possible d'ajouter au milieu réactionnel un solvant organique miscible à l'eau à une concentration finale pouvant atteindre 20 % en volume lorsqu'il s'agit d'un alcool tertiaire tel que le butanol tertiaire ou 10 % en volume lorsqu'il s'agit du diméthylformamide ou du tétrahydrofurane.

40 La réaction est effectuée à température ambiante pendant un temps variant de quelques minutes à quelques heures. Après quoi, une dialyse ou une filtration sur gel permet d'éliminer les produits de faible masse moléculaire et, en particulier, les excès de réactifs. Ce procédé permet d'introduire un nombre de groupements substituants par mole de protéine habituellement compris entre 1 et 15.

En utilisant de tels composés, le couplage avec la protéine P1 est réalisé par mise en présence des deux protéines en solution aqueuse de pH compris entre 6 et 8, à une température ne dépassant pas 30 °C, pendant un temps variant de 1 heure à 24 heures. La solution aqueuse obtenue est éventuellement dialysée pour éliminer les produits de faible masse moléculaire, puis le conjugué peut être purifié par diverses méthodes connues.

Ainsi, les imidazolides selon l'invention conviennent comme agent de couplage des protéines P1 et P2. Ils permettent l'obtention des nouveaux produits ayant la formule statistique :



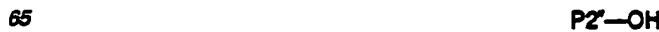
dans laquelle P2'' représente le radical d'une protéine choisie parmi

55 (a) tout anticorp ou fragment d'anticorp ou toute immunoglobuline ou fragment d'immunoglobuline ou toute molécule dérivant des précédentes par modification artificielle de l'un quelconque de leurs groupements fonctionnels ; et

(b) la sous-unité A de la ricine ou toute molécule dérivant de ladite sous-unité A par modification artificielle de l'un quiconque de leurs groupements fonctionnels ;

60 ledit radical étant privé d'un ou plusieurs groupes hydroxyles phénoliques des tyrosines  
— l'atome d'oxygène est celui des groupes hydroxyles phénoliques manquant dans le radical P2'' ;  
— E et G sont tels qu' définis ci-dessus.

Les produits de formule IX sont préparés en faisant réagir un produit de formul



dans laquelle P2' est tel que défini ci-dessus et le groupe hydroxyle est l'hydroxyl phénolique manquant dans les tyrosines du radical P2', avec un composé de formule I ci-dessus à une température de 10 à 40 °C dans un solvant aqueux contenant éventuellement un solvant organique miscible à l'eau, tel que par exemple un solvant éthéral comme le dioxane ou le tétrahydrofurane.

5 Les exemples qui suivent permettent de mieux comprendre l'invention sans en limiter la portée.  
Dans tous ces exemples, la préparation des conjugués sera décrite à partir de la chaîne A de ricine sous sa forme native, telle qu'elle est obtenue par le procédé décrit dans le brevet US 4 340 535.

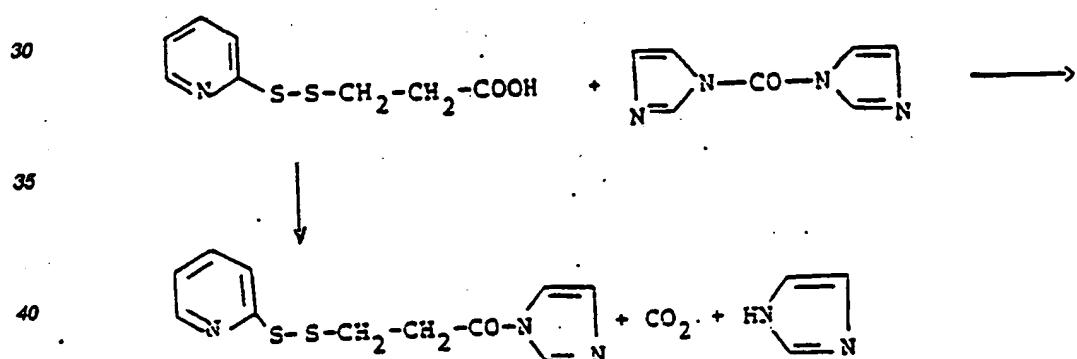
10 Les anticorps utilisés dans ces exemples sont :  
soit l'anticorps monoclonal T101 dirigé contre l'antigène T65 présent sur les lymphocytes T humains et de nombreuses lignées de cellules de leucémies T humaines. Cet anticorps est celui décrit dans Journal of Immunology 125 (2), 725-7 (1980). Il est commercialement disponible auprès de HYBRITECH Inc. SAN DIEGO, California, USA  
soit l'anticorps monoclonal AT15E, dirigé contre l'antigène Thy 1.2 des lymphocytes murins. Cet anticorps est celui décrit dans Journal of Immunology 122, 2491-8 (1979) et a été obtenu à partir de 15 l'hybridome décrit dans Hybridoma 1 (1) 13-17 (1981)  
soit un anticorps monoclonal anti-DNP.

## Exemple 1

20 P1 = anticorps T101 sur lequel on a introduit un SH par l'intermédiaire des amines.  
P2 = Chaîne A de ricine sur laquelle on a introduit un groupement disulfure activé par l'intermédiaire de l'hydroxyle des tyrosines.

## A) Préparation du réactif de couplage

25 Il s'agit de l'imidazolide dérivé de l'acide (pyridyl-2-disulfanyl)-3 propionique (APDP). Cet imidazolide s'obtient en une seule étape à partir de l'APDP et du carbonyl diimidazole (CDI).



45 430 mg d'acide (pyridyl-2-disulfanyl)-3 propionique sont dissous dans 2 ml de THF. A cette solution sont ajoutés 405 mg de CDI. Le mélange est agité 1/4 h à 25 °C. On observe un dégagement gazeux de CO<sub>2</sub>. Le milieu réactionnel est utilisé directement et immédiatement sans purification.

## B) Préparation de la chaîne A de ricine correctement fonctionnalisée

## 50 1) Blocage du thiol naturel par le N-éthylmaléimide

15 ml de solution aqueuse de chaîne A de ricine à 8 mg/ml (soit 4,1 micromoles de chaîne A) sont additionnés d'une solution aqueuse de mercapto-2-éthanol, de telle sorte que la concentration finale de ce dernier soit de 1 %.

La solution est laissée au repos une heure, puis dialysée en continu contre du tampon phosphate 125 mM pH 7 renouvelé pendant 40 heures à raison de 300 ml/h. Selon la méthode d'ELLMAN (Methods in Enzymology 25, 457, 1972), on a dosé 0,9 équivalent SH par mole de chaîne A de ricine.

On procède au blocage de cette fonction SH par le N-éthylmaléimide selon la méthode décrite dans Methods in Enzymology 11, 541 (1967). Pour cela, la chaîne A de ricine obtenue à l'étape précédente est incubée pendant 2 heures à 30 °C en présence de 20 équivalents de N-éthylmaléimide par mole de chaîne A. On élimine l'excès de réactif par dialyse en continu contre du tampon phosphate 125 mM pH 7 renouvelé pendant 20 heures à raison de 500 ml/h. On obtient ainsi 13 ml d'une solution de chaîne A de ricine à 7 mg/ml, n° présentant plus de groupements thiol dosables par le réactif d'ELLMAN. Le produit ainsi obtenu est désigné ultérieurement sous l'appellation chaîne A (NEM).

## 2) Modification des tyrosines

A 18 mg de chaîne A (NEM) dans 10 ml de tampon phosphate 125 mM pH 7 (soit 0,6 micromoles) sont ajoutés goutte à goutte 300 microlitres de la solution de réactif de couplage dans le THF obtenue précédemment. Le milieu réactionnel est agité 15 min. à 25 °C puis la solution est purifiée de l'excès de réactif par dialyse contre du tampon phosphate 125 mM pH 7. On obtient ainsi 9,5 ml d'une solution de chaîne A (NEM) modifiée à 1,55 mg/ml de protéine.

Par dosage spectrophotométrique à 343 nm de la pyridine thione-2 libérée par échange avec le mercapto-2 éthanol, on constate que l'on a obtenu une chaîne A (NEM) modifiée portant 1,6 groupements activateurs par mole de chaîne A (NEM).

## C) Préparation de l'anticorps modifié

A 45 mg d'une solution d'anticorps T101 à 9 mg/ml, soit 0,3 micromoles, sont ajoutés 25 microlitres d'une solution d'anhydride S-acétyl mercapto succinique (SAMSA) à 170 mg/ml dans le diméthylformamide. Le milieu réactionnel est agité pendant 2 heures à 4 °C puis purifié par dialyse des réactifs contre du tampon phosphate 125 mM pH 7 pendant 24 heures à un débit de 400 ml/heure. On obtient ainsi 4,1 ml d'une solution d'anticorps modifié à 8,8 mg/ml. A cette solution d'anticorps sont ajoutés 0,48 ml d'une solution de chlorhydrate d'hydroxyamine 0,5 M. Après une incubation de 1 h à 30 °C, le milieu réactionnel est purifié par dialyse des réactifs contre le tampon phosphate 125 mM pH 7.

Par dosage spectrophotométrique des groupements —SH ainsi libérés par la méthode d'ELLMAN, on constate que l'on a obtenu un anticorps portant 5 groupements activateurs par mole d'anticorps.

## D) Préparation de l'immunotoxine

A 2,1 ml de la solution d'anticorps précédemment obtenue (soit 0,11 micromole), on ajoute 5,2 ml de la solution de chaîne A modifiée (0,27 micromole). On laisse le mélange incuber 5 heures à 30 °C.

Le milieu réactionnel est purifié sur colonne de Sephadex G100 avec mesure de la densité optique de l'effluent à 280 nm. On obtient 17 ml d'une solution d'immunotoxine à 1,1 mg/ml (soit 18,7 mg). Cette solution contient 0,32 mg/ml en chaîne A (NEM) modifiée. Le taux de couplage moyen de cette préparation est de 2 chaînes A (NEM) par mole d'anticorps.

On obtient ainsi une immunotoxine de formule V ci-dessus, où :

A' est le radical de la sous-unité A de la ricine dont les groupes SH sont bloqués par le N-éthylmaléimide

P' est le radical de l'anticorps T101

W est un groupement de formule



dans laquelle

Y est  $\text{--CO--}$

E est  $\text{--CH--}$

$(\text{CH}_2\text{--COOH})$

E est  $\text{--CH}_2\text{--CH}_2\text{--}$

Y est  $\text{--CO--}$

Z est  $\text{--O--}$

n est 1.

## E) Test d'activité des immunotoxines

La propriété biologique fondamentale de la chaîne A de ricine est d'inhiber la synthèse protéique dans les cellules eucaryotes par altération de la sous-unité ribosomale 60S.

Les tests réalisés sont donc des tests d'inhibition de la synthèse protéique :

soit sur un modèle acellulaire (test no 1)

soit sur un modèle cellulaire (test no 2)

## 1) Le modèle acellulaire (test no 1)

Le protocole *in vitro* utilise des fractions subcellulaires de foie de rat convenablement complémentées et capables d'incorporer la <sup>14</sup>C-phénylalanine en présence d'un ARN messager artificiel : l'acide polyuridylque.

Le mode opératoire employé pour préparer les fractions subcellulaires et pour mesurer l'incorporation de <sup>14</sup>C-phénylalanine est une adaptation de la méthode décrite dans Biochimica Biophysica Acta 312, 608-615 (1973), mettant en œuvre à la fois une fraction microsomale et une fraction de cytosol des hépatocytes de rat. L'échantillon contenant la chaîne A est introduit sous la forme d'une solution

convenablement diluée dans un tampon Tris HCl 50 mM, pH 7,6 contenant du mercapto-2 éthanol à 0,2 % et de la sérum albumine bovine à 15 microgrammes/ml. A partir des données de comptage, on calcule par rapport à un milieu témoin sans inhibiteur le pourcentage d'inhibition d'incorporation d'14C-phénylalanine dans les protéines pour chaque milieu réactionnel contenant de la chaîne A de ricine. L'ensemble de ces valeurs permet de déterminer la concentration de chaîne A de ricine (ou CI50) qui inhibe 50 % d'incorporation de la 14C-phénylalanine dans les conditions de l'essai.

## 2) Le modèle cellulaire (test no 2)

10 Ce test mesure l'effet des substances étudiées sur l'incorporation de 14C-leucine dans des cellules cancéreuses en culture.

Les cellules utilisées dépendent de la spécificité de l'anticorps choisi pour la fabrication de l'immunotoxine. Dans cet exemple, il s'agit de cellules de la lignée lymphoblastoïde humaine CEM portant naturellement l'antigène T65.

15 Ces cellules sont incubées en présence de préparations des substances à étudier puis soumises en fin d'incubation à une mesure de leur taux d'incorporation de 14C-leucine.

Cette mesure est effectuée selon une technique adaptée de la technique décrite dans Journal of Biological Chemistry 249 (11), 3557-3562 (1974) utilisant le tracteur 14C-leucine pour la détermination du taux de synthèse protéique. La détermination de la radioactivité incorporée est effectuée ici sur les 20 cellules entières isolées par filtration.

A partir de ces déterminations, on peut tracer les courbes effets/doses présentant en abscisse la concentration des substances étudiées et en ordonnée l'incorporation de 14C-leucine exprimée en pourcentage de l'incorporation par des cellules témoins en l'absence de la substance à étudier. On peut ainsi déterminer pour chaque substance étudiée la concentration qui inhibe de 50 pour cent l'incorporation de 14C-leucine dans les cellules ou « concentration inhibitrice 50 » (CI50). On a vérifié que la mesure d'incorporation de la 14C-leucine dans les cellules entières conduit à la détermination de CI50 identiques à celles obtenues par la méthode classique de mesure de la synthèse protéique.

## Résultats

30 a) Test no 1 (modèle acellulaire)

L'activité inhibitrice de la chaîne A (NEM) modifiée a été déterminée. La CI50 est égale à  $3,6 \cdot 10^{-10}$  mole/litre. La CI50 de la chaîne A témoin de l'expérience est de  $1,2 \cdot 10^{-10}$  mole/l. Il n'y a donc pas de 35 perte d'activité significative de la chaîne A modifiée.

b) Test no 2 (modèle cellulaire)

Dans les conditions expérimentales définies ci-dessus, la CI50 en présence d'activateur (monensine 40 50 nM) est de  $1,2 \cdot 10^{-12}$  mole/l, ce qui représente une activité 5 :  $10^4$  fois supérieure à celle de la chaîne A (CI50 =  $6 \cdot 10^{-9}$  mole/l).

## Exemple 2

45 P1 = chaîne A de ricine à l'état natif.

P2 = anticorps T101 sur lequel on a introduit un groupement disulfure activé par l'intermédiaire de l'hydroxyde des tyrosines.

A) Préparation du réactif de couplage : Identique à celle décrite à l'exemple 1

50 B) Préparation de l'anticorps modifié

A 12,8 mg d'anticorps T101 dans 2,8 ml de tampon phosphate 125 mM pH 7, sont ajoutés goutte à goutte 34 microlitres de la solution de THF diluée au 1/2 décrite précédemment (200 équivalents/mole 55 d'IgG). Le milieu réactionnel est agité 1/4 h à température ambiante puis purifié par dialyse. On obtient ainsi 2,6 ml d'une solution d'anticorps modifié à 4,55 mg/ml.

Par dosage spectrophotométrique à 343 nm de la pyridine thione-2 libérée par échange avec le mercapto-2 éthanol, on constate que l'on a obtenu un anticorps portant 2,2 groupements activateurs par mole d'anticorps.

60 C) Préparation d' l'immunotoxine

A 750 microlitres d'une solution de chaîne A de ricine à 7,1 mg/ml (soit 0,177 micromoles) sont ajoutés 2,5 ml d'une solution d'anticorps activé à 4,55 mg/ml (soit 0,075 micromoles d'anticorps). On laisse le mélange incuber 18 h à 25 °C. Le milieu réactionnel est purifié sur colonne de Sephadex G100

EP 0 169 112 B1

comme décrit à l'exemple 1. On obtient 13 ml d'une solution d'immunotoxine à 0,8 mg/ml (soit 10,4 mg). Cette solution contient 0,2 mg/ml de chaîne A. Le taux de couplage moyen de cette préparation est de 1,5 chaîne A par mole d'anticorps.

On obtient ainsi une immunotoxine de formule VI ci-dessus, où :

5 A' est le radical de la sous-unité A de la ricine

P' est le radical de l'anticorps T101

W' est un groupement de formule



10 dans laquelle

Z' est —O—

Y' est —CO—

E' est —CH<sub>2</sub>—CH<sub>2</sub>—

15 n est zéro — m est 1,5

D) Tests d'activité

Test no 2 (modèle cellulaire)

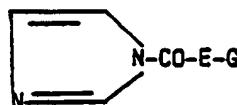
20 Dans des conditions expérimentales identiques à celles de l'exemple 1, la C<sub>50</sub> en présence d'activateur (Monensine 50 nM) est de  $3,5 \cdot 10^{-13}$  mole/l ce qui représente une activité cytotoxique  $1,5 \cdot 10^5$  fois supérieure à celle de la chaîne A dans la même expérience ( $C_{50} = 0,6 \cdot 10^{-8}$  mole/l).

25

Revendications (pour les Etats contractants : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE)

1. Imidazolides de formule :

30



dans laquelle :

35 E représente un groupe —(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>— où p est un nombre entier de 2 à 7 ou un groupe



40

G est un groupement de structure —S—S—X, où X est un radical activateur choisi parmi les groupes 2-pyridyle et 4-pyridyle non substitués ou substitués par un ou des halogènes ou des radicaux alkyle contenant jusqu'à 5 atomes de carbone, carboxyle, alcoxycarbonyle dont le groupe alkoxy contient jusqu'à 5 atomes de carbone ; le groupe phényle non substitué ou substitué par un ou des halogènes ou

45 des groupes nitro, alkoxy contenant jusqu'à 5 atomes de carbone, carboxyle ou alcoxycarbonyle dont le groupe alkoxy contient jusqu'à 5 atomes de carbone, ou un groupe alcoxycarbonyle dont le groupe alkoxy contient jusqu'à 5 atomes de carbone.

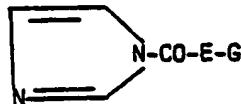
2. Utilisation des imidazolides selon la revendication 1 comme réactif de couplage des protéines.

50

Revendications (pour l'Etat contractant AT)

1. Procédé pour l'obtention d'imidazolides de formule :

55



60 dans laquelle :

E représente un groupe —(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>— où p est un nombre entier de 2 à 7 ou un groupe



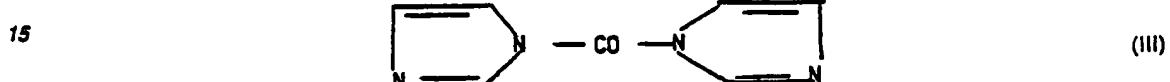
65

EP 0 169 112 B1

G est un groupement de structure —S—S—X, où X est un radical activateur choisi parmi les groupes 2-pyridyle et 4-pyridyle non substitués ou substitués par un ou des halogènes ou des radicaux alkyle contenant jusqu'à 5 atomes de carbone, carboxyle, alcoxycarbonyle dont le groupe alcoxy contient jusqu'à 5 atomes de carbone ; le groupe phényle n'est pas substitué ou substitué par un ou des halogènes ou des groupes nitro, alcoxy contenant jusqu'à 5 atomes de carbone, carboxyle ou alcoxycarbonyle dont 1 groupe alcoxy contient jusqu'à 5 atomes de carbone, ou un groupe alcoxycarbonyle dont le groupe alcoxy contient jusqu'à 5 atomes de carbone, caractérisé en ce qu'il consiste à faire réagir un composé de formule :



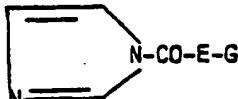
dans laquelle G et E sont tels que définis ci-dessus, avec le carbonyldiimidazole de formule :



20 dans un solvant organique, à la température de 10 à 40 °C.  
2. Utilisation des imidazolides selon la revendication 1 comme réactif de couplage de protéines.

**Claims (for the Contracting States : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE)**

**25      1. Imidazolides of the formula :**



30

**in which :**

E represents a group  $-(CH_2)_p-$ , in which p is an integer from 2 to 7, or a group

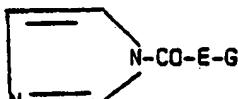


40 G is a group of the structure —S—S—X, in which X is an activating radical chosen from pyridin-2-yl and pyridin-4-yl groups which are unsubstituted or substituted by one or more halogens or alkyl radicals containing up to 5 carbon atoms, carboxyl or alkoxy carbonyl radicals, of which the alkoxy group contains up to 5 carbon atoms; the phenyl group which is unsubstituted or substituted by one or more halogens or nitro, alkoxy groups containing up to 5 carbon atoms, carboxyl or alkoxy carbonyl groups of which the alkoxy group contains up to 5 carbon atoms, or an alkoxy carbonyl group of which the alkoxy group contains up to 5 carbon atoms.

## 2. Use of the imidazolidines according to claim 1 as protein coupling reagent.

**50 Claims (for the Contracting State AT)**

**1. A process for the preparation of imidazolides of the formula :**



60 E represents a group  $-(\text{CH}_2)_p-$ , in which p is an integer from 2 to 7, or a group



**EP 0 169 112 B1**

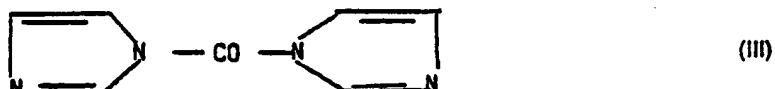
G is a group of the structure —S—S—X, in which X is an activating radical chosen from pyridin-2-yl and pyridin-4-yl groups which are unsubstituted or substituted by one or more halogens or alkyl radicals containing up to 5 carbon atoms, carboxyl or alkoxy carbonyl radicals, of which the alkoxy group contains up to 5 carbon atoms ; the phenyl group which is unsubstituted or substituted by one or more halogens or nitro, alkoxy groups containing up to 5 carbon atoms, carboxyl or alkoxy carbonyl groups of which the alkoxy group contains up to 5 carbon atoms, or an alkoxy carbonyl group of which the alkoxy group contains up to 5 carbon atoms, characterized in that it consists in reacting a compound of the formula :



10

in which G and E are as defined above, with the carbonyldiimidazole of the formula :

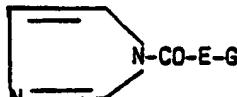
15



20 in an organic solvent at the temperature of 10 to 40 °C.  
2. Use of the imidazolides according to claim 1 as a protein coupling reagent.

**Patentansprüche (für die Vertragsstaaten : BE, CH, DE, FR, GB, IT, LI, LU, NL, SE)**

25 1. Imidazolide der Formel :



30

worin :

E eine Gruppe —(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>—, in der p eine ganze Zahl von 2 bis 7 ist, oder eine Gruppe

35



CH<sub>2</sub>COOH repräsentiert und

40 G eine Gruppe der Struktur —S—S—X ist, wo X ein Aktivator-Radikal ist, ausgewählt aus den Gruppen 2-Pyridyl und 4-Pyridyl, nicht substituiert oder substituiert durch ein oder mehrere Halogene oder Alkyl-Radikale, die bis 5 Kohlenstoffatome aufweisen, Karboxyl-, Alkoxykarbonyl-Radikale, deren Alkoxygruppe bis zu 5 Kohlenstoffatome aufweist ; die Phenylgruppe, nicht substituiert oder substituiert durch ein oder mehrere Halogene oder Nitro-, Alkoxygruppen, die bis 5 Kohlenstoffatome aufweisen, Karboxyl- oder Alkoxykarbonylgruppen, deren Alkoxygruppe bis 5 Kohlenstoffatome aufweist, oder eine

45 Alkoxykarbonylgruppe, deren Alkoxygruppe bis 5 Kohlenstoffatome aufweist.

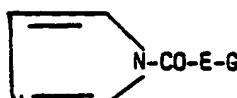
2. Verwendung der Imidazolide gemäß Anspruch 1 als Proteinkupplungsreagenz.

50

**Patentansprüche (für den Vertragsstaat AT)**

55

1. Verfahren zur Herstellung von Imidazoliden der Formel :



55

worin :

E eine Gruppe —(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>—, in der p eine ganze Zahl von 2 bis 7 ist, oder eine Gruppe

60



CH<sub>2</sub>COOH repräsentiert und

65

G eine Gruppe der Struktur —S—S—X ist, wo X ein Aktivator-Radikal ist, ausgewählt aus den

Gruppen 2-Pyridyl und 4-Pyridyl, nicht substituiert oder substituiert durch ein oder mehrere Halogene oder Alkyl-Radikale, die bis 5 Kohlenstoffatome aufweisen, Karboxyl-, Alkoxykarbonyl-Radikale, deren Alkoxygruppe bis zu 5 Kohlenstoffatome aufweist; die Phenylgruppe, nicht substituiert oder substituiert durch ein oder mehrere Halogene oder Nitro-, Alkoxygruppen, die bis 5 Kohlenstoffatome aufweisen,

- 5 Karboxyl- oder Alkoxykarbonylgruppen, deren Alkoxygruppe bis 5 Kohlenstoffatome aufweist, oder in Alkoxykarbonylgruppe, deren Alkoxygruppe bis 5 Kohlenstoffatome aufweist, dadurch gekennzeichnet, dass es darin besteht, eine Verbindung der Formel:



10

worin G und E wie oben definiert sind, mit dem Karbonyldiimidazol der Formel:

15



in einer organischen Lösung bei der Temperatur von 10 bis 40 °C reagieren zu lassen.

2. Verwendung der Imidazole gemäss Anspruch 1 als Proteinkupplungsreagenz.

20

25

30

35

40

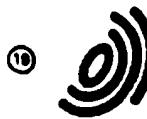
45

50

55

60

65



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11) Publication number:

0 094 844

A2

(12)

## EUROPEAN PATENT APPLICATION

(21) Application number: 83302831.9

(51) Int. Cl.3: A 61 K 47/00  
C 07 C 103/52

(22) Date of filing: 18.05.83

(30) Priority: 18.05.82 US 379463

(43) Date of publication of application:  
23.11.83 Bulletin 83/47

(44) Designated Contracting States:  
AT BE CH DE FR GB IT LU NL SE

(71) Applicant: THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF  
CALIFORNIA  
2200 University Avenue  
Berkeley, California 94720(US)

(72) Inventor: Goodman, Murray  
9760 Black Gold Road  
La Jolla California 92037(US)

(72) Inventor: Castagnoli, Neal  
27 Blossom Road  
San Rafael California 94901(US)

(72) Inventor: Jacobson, Kenneth Alan  
c/o The Weizmann Institute of Science  
IL-76100 Rehovot(IL)

(72) Inventor: Melmon, Kenneth Lloyd  
51 Cregmont Way  
Woodside California 94602(US)

(72) Inventor: Rosenkranz, Roberto Pedro  
562 Sand Hill Circle  
Menlo Park California 94025(US)

(72) Inventor: Velander, Michael Stephen  
407 7th Street  
Del Mar California 92014(US)

(74) Representative: Skales, Humphrey John et al.  
Frank B. Dehn & Co. Imperial House 15-19 Kingsway  
London WC2B 6UZ(GB)

A2

(64) Drug-carrier conjugates.

(57) Biologically active drugs, e.g. catecholamine hormones, are coupled to carrier molecules, e.g. monodisperse peptides to produce conjugate molecules. The conjugate molecules retain biological activity, but the pharmacokinetic, pharmacodynamic and/or potency properties of the drug is modified. The drug is coupled to the carrier via a spacer moiety which not only serves to covalently link the drug to the carrier, but also insulates the biologically active portion of the drug, i.e., the pharmacophore, from degradation during the coupling process. The carrier preferably consists of a monodisperse peptide in which the sequence of amino acid residues is carefully preselected and controlled.

EP

- 1 -

DRUG-CARRIER CONJUGATESDescriptionField of The Invention

This invention relates to the coupling of  
5 biologically active molecules or derivatives of such  
molecules with organic carriers to thereby modify the  
pharmacokinetic, pharmacodynamic and/or potency  
properties of the naturally occurring bio-active  
molecules i.e., drugs. The coupling preferably  
10 requires the presence of a suitable spacer moiety which  
links the naturally occurring drug, or a derivative, to  
the carrier. Thus the drug derivative is covalently  
bound to the carrier. The carrier may be any of a  
broad range of organic moieties which may either be  
15 themselves biologically active, but more usually are  
biologically acceptable in vivo. Peptides are  
especially suitable as carriers.

Background of the Invention

In the past there has been extensive work by  
20 a number of pharmaceutical and chemical investigators  
on techniques for chemically altering and/or modifying  
the bio-activities of naturally occurring bio-active  
molecules. These investigations have attempted to  
alter or modify such molecules in an effort to increase  
25 specific bio-activity, prolong bio-activity, reduce  
toxic effects, reduce or eliminate side effects, narrow  
the biological activity, or change biologic  
specificity. Very often chemical modification of bio-  
active molecules removed or greatly reduced bio-  
30 activity, but in some instances bio-activity has been  
enhanced, modified or changed in a useful way. In view  
of past successes there has been extensive

investigation into the chemical modification of bio-active molecules in an effort to usefully influence their activity.

- Numerous studies have been made on the
- 5 covalent bonding of bio-active molecules (drugs) to some type of physiologically acceptable carrier for the purpose of modifying bio-activity. Thus it is expected that the carrier may either affect the intensity of activity, shorten or prolong the
- 10 activity, redirect the activity, and/or reduce side effects, etc. of the drug. On the other hand, a carrier coupled as an integral part of the bio-active molecule introduces a large number of additional variables which may affect the activity and
- 15 acceptability of the modified drug in an in vivo environment. The carrier could block the biological activity, i.e., interfere with the pharmacophore's ability to bind to its normal receptors; or it may itself exhibit bio-activity antagonistic to that of
- 20 the pharmacophore; or the carrier may prove to be antigenic and invoke a response from the host immune system, etc. Therefore the selection and preparation of a useful and acceptable drug-carrier system potentially presents a number of problems.
- 25 Nonetheless, the potential advantages to be gained utilizing such drug modification techniques has led to continued investigations in this area.

- As used herein the term "drug" shall mean any molecular entity, e.g. a hormone, which has
- 30 specific biological activity. "Pharmacophore" shall mean the bio-active or binding site portion of a drug molecule. The term "congener" shall mean a drug that has had its molecular structure chemically modified to form a functionalized derivative. The term

"carrier" shall mean a physiologically acceptable molecular structure, e.g. a peptide, that is used to covalently bind to a drug in its congener form. The term "spacer" means a bridging chemical grouping that 5 modifies the drug structure to remove the pharmacophore from close proximity of the carrier. The spacer has a functional group added at the end thereof to facilitate attachment of the drug to the carrier. The drug plus attached spacer and 10 associated functional group comprise a "congener". The drug is linked through the spacer and the associated functional group to the carrier to form a "conjugate". Other terms will be defined where necessary as they occur in the following 15 description.

A number of prior investigators have shown that it is possible to alter pharmacological properties of certain biologically active molecules through covalent attachment to carriers without 20 losing their ability to bind at a receptor and to stimulate biological activity. Donaruma et al. in the monograph "Polymeric Drugs" Academic Press, New York 1978 and Gregoriadis in "Drug Carriers in Biology and Medicine" Academic Press London, 1979, 25 as well as the articles by Ringsdorf in the Journal of Polymer Science Symposium No. 51, 135-153 (1975); and Donaruma in Progress in Polymer Science 4, 1-25 (1975); and Batz in Advances in Polymer Science 23, 25-53 (1977) review a number of examples of drugs 30 which have been bound covalently to soluble or insoluble polymers which may be either natural or synthetic. For example, Weiner and Zilkha noted in the Journal of Medicinal Chemistry 16, 573-574 (1973) the attachment of a local anesthetic,

procaine, to polyethylene oxide. They found that the conjugate remained biologically active and had a prolonged duration of action. Godeau et al. in The Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 75, 2353-2357 (1978) reported linking a progesterone analog to polyethylene oxide. The conjugate retained activity to induce maturation in certain oocytes sites. Ringsdorf et al. in Die Makromolekulare Chemie, 177, 741-746 (1976) observed anti-viral activity in polymethacrylate derivatives of 1-adamantaneamine.

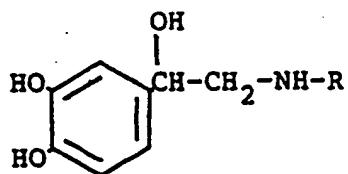
The group of sympathomimetic hormones which are known as catecholamines because of their chemical structures form a class of bio-active compounds which are suitable drugs for attachment to carrier moieties. The receptors for catecholamines are located on the outer surface of cell membranes and the observed biological effect of the attachment of such hormones to carriers need not be dependent upon, or complicated by, complex membrane transport phenomena or phagocytosis of a conjugate molecule. It is possible for covalent conjugates of the catecholamines to reach the catecholamine receptor sites intact.

On the other hand, the catecholamines themselves have several clinical limitations such as, rapid systemic depletion, problems arising from lack of tissue specificity, and decrease in responsiveness to the drug, which also enhance their candidacy for attachment to carrier moieties. It is to be expected that carrier-attached catecholamines might be degraded less readily by enzymes; and that the carrier might also impart greater specificity to the drug action.

Other drugs which have related structures and suffer from similar limitations to those outlined above are also suitable candidates for covalent attachment to carriers. These drugs

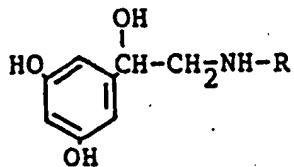
- 5 include other sympathomimetic drugs such as dopamine, phenylephrine, the amphetamines, ephedrine and related drugs; and also the so-called autacoids, which include histamine, 5-hydroxytryptamine (serotonin), the prostaglandins and related  
10 compounds. For the purpose of the discussion that follows, it should be understood that where reference is made to "the drug" or "the catecholamine", these other related drugs are meant to be included.

- 15 The chemical structure of the principal catecholamine hormones are as follows:

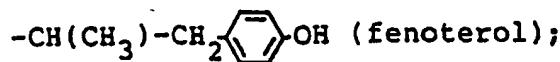


- 20 where R may be -H (norepinephrine); -CH<sub>3</sub> (epinephrine); -CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (isoproterenol).

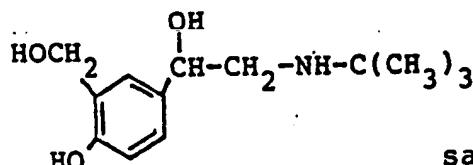
- There are a number of compounds closely related to the catecholamines which also exhibit physiological effects, principally as  $\beta_2$  agonists  
25 (glands, smooth muscle, lungs). Such related compounds include the resorcinolamines:



where R may be  $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  (metaproterenol);

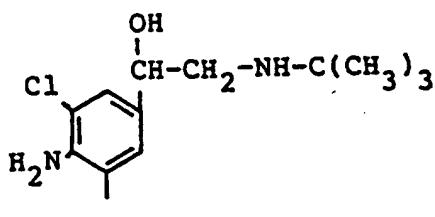


$-\text{C}(\text{CH}_3)_3$  (terbutaline); and the saligenin derivative:



salbutamol; and  
the compound,

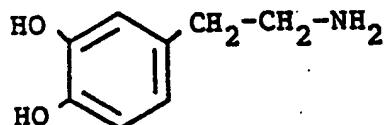
5



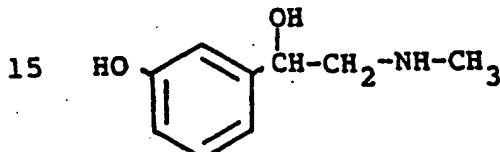
clenbuterol.

For convenience, when catecholamines are  
hereafter mentioned, all such related compounds are  
also meant to be included.

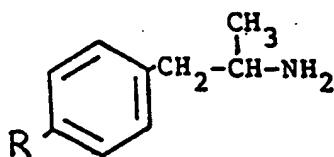
10 Other sympathomimetic drugs include:



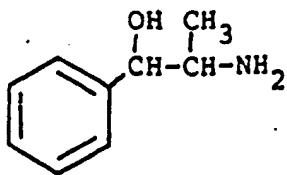
dopamine;



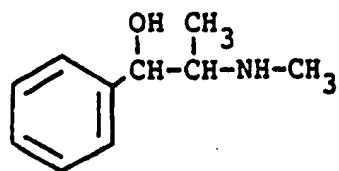
phenylephrine;



the amphetamines,  
where R may be H  
(amphetamine) or OH  
(hydroxyamphetamine);

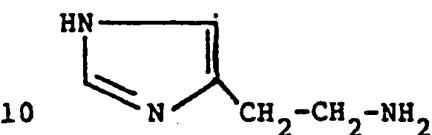


phenylpropanolamine;  
and

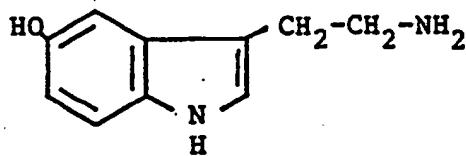


ephedrine.

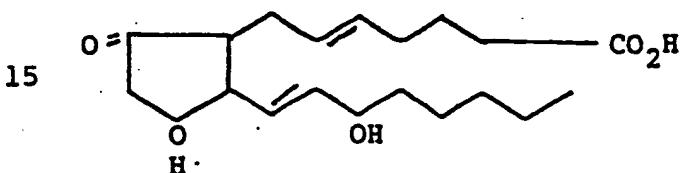
The structures of the important autacoids  
are:



histamine;



5-hydroxytryptamine  
(serotonin); and



prostaglandin E<sub>2</sub>.

Norepinephrine is a primary  
phenethylamine, while epinephrine is its N-methyl  
derivative. Isoproterenol is the synthetic N-  
20 isopropyl analog of epinephrine with selective

$\beta$ -adrenergic activity. In all instances the phenyl ring contains hydroxyl groups in an ortho orientation (catechol). The basic catecholamine hormones are associated with the contraction of smooth muscle tissue (alpha-adrenergic response); and the relaxation of smooth muscle tissue ( $\beta$ -adrenergic response). The catecholamines also stimulate the sympathetic nervous system and are clinically useful drugs for the modulation of endocrine-cardiovascular and renal functions. Some of the catecholamine hormones e.g. isoproterenol act as bronchodilators, as heart stimulants, etc.

Other related sympathomimetic drugs have a variety of effects which include actions on peripheral and cardiovascular  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic receptors, metabolic effects and effects on the central nervous system. The autacoids also have a similarly broad range of effects. Histamine, for example, both stimulates the contraction of smooth muscle, such as those of the bronchi and gut and also relaxes others, such as those of fine blood vessels, as well as stimulating the production of gastric acid and eliciting various other exocrine secretions. 5-Hydroxytryptamine (serotonin) is responsible for a wide variety of effects in the cardiovascular, respiratory and gastrointestinal systems. The prostaglandins have even more diverse actions which include vasodilation, inhibition of platelet aggregation, contraction or relaxation of smooth muscle, central nervous system, endocrine and metabolic effects.

Catecholamines are deactivated metabolically by several routes and, as a result,

- have short durations of action in vivo. Catechol O-methyl transferase methylates the hydroxyl group at the three position and the product is inactive. Sulfonation of the same hydroxyl group also occurs
- 5    in vivo, mainly in the intestines, accounting for inactivation after oral administration.
- Catecholamines are also labile to enzymatic and non-enzymatic oxidation producing adrenochromes and other inactive species.
- 10      Like the catecholamines, other sympathomimetic drugs and autacoids also undergo similarly complex metabolic deactivation processes in vivo which severely limit their clinical usefulness as drugs.
- 15      Because of the above-noted in vivo limitations, catecholamine hormones and the other related drugs noted above are prime candidates for modification through covalent bonding to carrier moieties.
- 20      Catecholamine hormones have been immobilized on porous glass beads (see Kaplan et al., Proceedings of the National Academy of Sciences USA 69, 1141-1145 (1972); Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70, 1214-1217
- 25      (1973); Proceedings of the National Academy of Sciences USA 72, 824-828 (1975); Methods in Enzymology 38, 180-186 Academic Press (1974)). The hormones were bound via diazotization onto arylamine glass. The glass bound drugs demonstrated dramatic ability to increase heart rate in anesthetized dogs
- 30      and in chick embryos and to stimulate cyclic AMP production in cultured glial tumor cells. These immobilized catecholamines also had a positive inotropic effect on isometrically-contracting cat

papillary muscles. Linkage to the glass beads occurred via an arylazo group attached to the hormone ring structure. Although the observed bioactivity was attributed to the covalently bound 5 hormone-glass species there have been observations that, in fact, there was some decoupling of hormone from the porous glass. The decoupled hormone would therefore be available to produce the observed biological effects.

10 Several investigators (see Melmon et al., Journal of Clinical Investigation 53, 22-30 (1974); Shear et al. Journal of Biological Chemistry 251, 7572-7576 (1976); Poon et al., Molecular Pharmacology, 1977) immobilized catecholamines and 15 other autacoids onto Sepharose through amino groups and via a random co-polypeptide system and proteins as affinity attractants for lymphocytes having receptors. Cells which were responsive to the hormones were bound to the support and could be 20 displaced by competitive antagonists or by high concentrations of hormones.

Pitha et al. in Proceedings of the National Academy of Sciences USA 77, 2219-2223 (1980); Verlander et al. in Proceedings in the 25 National Academy of Sciences USA 73, 1009-1012 (1976); Venter et al. in Polymeric Delivery Systems, Midland Macromolecular Symposium No. 5, 237-250 (1978); Goodman et al. in Journal of Macromolecular Science - Chemistry, A13, 529-543 (1979); Hu et al. 30 in Molecular Pharmacology 14, 237-245 (1977); Melmon et al. in Molecular Pharmacology 12, 701-710 (1976); and Weinstein et al. in Journal of Clinical Investigation 52, 1349-1361 (1973) reported soluble conjugates of beta agonists and antagonists and

autacoids. In the work of Verlander, Goodman and their co-workers isoproterenol was bound to a random copolyptide by the same chemical means utilized in the porous glass binding. Random copolymers 5 containing hydroxypropylglutamine and p-aminophenylalanine were diazotized and coupled with isoproterenol. The hormone was bonded to the peptide via an azo group. The azo group was coupled to the hormone at the six carbon position on the 10 catechol ring structure. Such coupled hormone-azo-peptide structures exhibited substantial biological activity and prolonged biological effect.

Melmon et al. in Molecular Pharmacology 12, 701-710 (1976) and in the Journal of Clinical 15 Investigation 52, 1349-1361 (1973) reported catecholamine conjugates wherein catecholamines and autacoids were coupled to albumin or to a random copolymer of alanine and tyrosine. Norepinephrine was coupled to primary amines of the carriers by 20 condensation with a bifunctional reagent, glutaraldehyde. The resulting diimine was reduced with sodium borohydride to the disubstituted diamine. Coupling by such means, however, does not yield a single product. Two drugs of the same type 25 may be linked to one another, or two carriers may be joined together. Thus the desired conjugate yields in such coupling reactions can be very low. It is not possible to predict the structure of the resulting conjugates.

30 All such prior reported catecholamine conjugates suffered from low yields of products whereby the techniques are of no economic importance or the reaction products yield a "gemisch" of products which may or may not be conjugates; and if

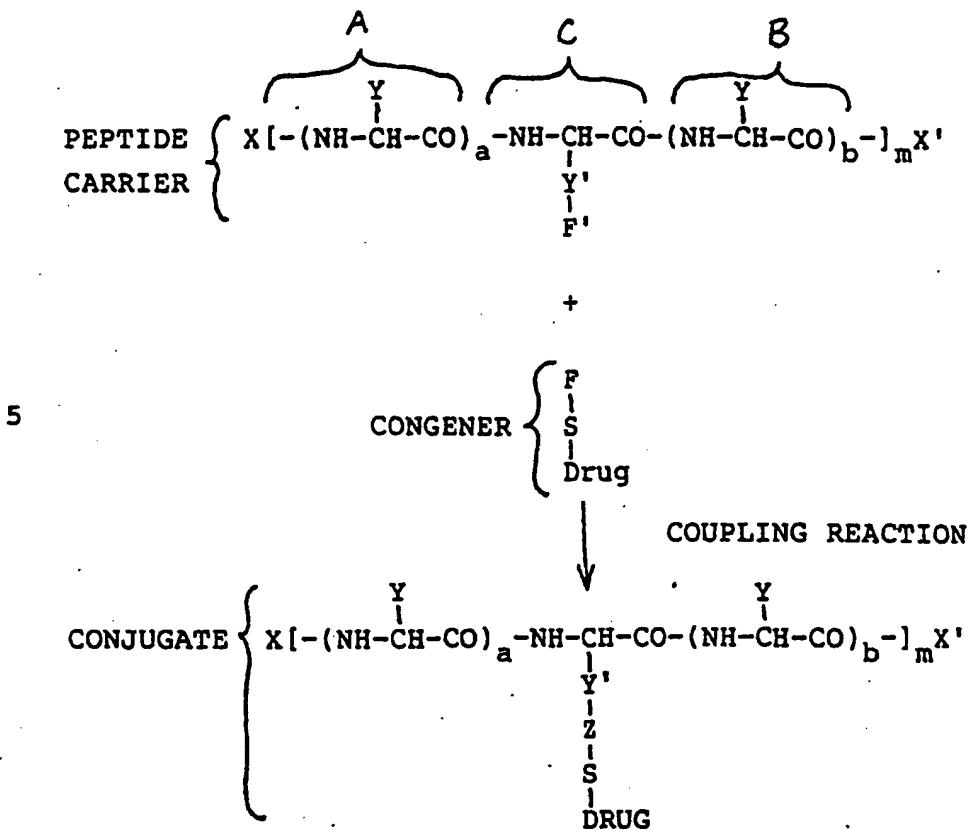
conjugates the chemical structure thereof is unpredictable and/or very difficult to determine. Thus it is desirable to develop techniques for producing conjugates in good yield; with predictable and specific chemical structures; and yet retain and/or exhibit at least one or more of the desired biological activities of the drug component.

Brief Description of the Invention

The present invention deals with drug-carrier conjugates, specifically conjugates of the bioactive catecholamine hormones, related sympathomimetic drugs and autacoids that have been attached to carrier moieties that have been chemically precisely defined. The use of such precisely defined carriers and the particular methods for producing the conjugates therefrom results in conjugates whose chemistry is fully defined, thus facilitating the interpretation of their biological activity. The conjugates of the present invention, which are derived from precisely defined carriers, permit more efficient methods for purification and detection of impurities.

More specifically, the present invention contemplates the preparation of conjugates linking a functionalized drug (congener), e.g., a catecholamine hormone derivative, to a carrier molecule, e.g., a peptide, by covalent bonds. A functional spacer is utilized for covalent linkage to the drug and to the carrier, yet it does not interfere with the pharmacological properties of the drug. It also provides a chemically stable linkage with the carrier; and facilitates good yields of the conjugate.

The conjugates of the invention may be most easily conceptualized from the following:



where:

- S is a schematic representation of  
10 the spacer group attached to the  
drug; and
- F is a schematic representation of the  
functional group attached to the  
spacer, where Drug-S-F comprise the  
15 congener;
- F' is a schematic representation of a  
functional group attached to the  
carrier side chain, Y', of the amino  
acid residue to which the congener  
is bound and wherein the functional  
group F' is reactive with functional  
group F;

- Z is a schematic representation of the reacted groups F and F' whereby the congener is bound to the carrier.
- 5 A,B are oligopeptide blocks wherein the amino acid residues are the same, or different with predesigned sequences.
- C is an amino acid residue to which the congener is bound.
- 10 X is an amine blocking group, or -H  
X' is a carboxyl blocking group, or -H  
Y is a general amino acid residue side chain  
Y' is a side chain on the amino acid residue to which the congener is bound
- 15 a=b; a≠b; a or b can be 0, or an integer, conveniently a low integer (eg 1,2,3 or 4) and m = 1,2,3, etc.
- 20 As will be apparent from the general structure above, the drug is bound via a spacer and reacted functional group moiety, Z, to the C amino acid residue side chain Y' of the carrier peptide A-C-B. The carrier consists of a monodisperse peptide 25 wherein blocks A and B may be homo-oligopeptide blocks, i.e., wherein the amino acid residues are identical, or alternately, several different amino acid residues in a predetermined sequence. A particular amino acid residue, C, is positioned at a 30 predetermined position in the peptide chain. Amino acid residue, C, which consists of a single amino acid residue, is selected to be reactive with the particular congener to be attached to the carrier.
- 35 It should also be understood that the peptide carrier blocks A,B and C may be linked with homologous blocks A,B and C to form carrier peptides

of increasingly greater molecular weights, e.g.,  $[A-C-B]_m [A-C-B]_n$ , where  $m=1,2,3$ , etc. and  $n=0,1,2,3$ , etc. and where the sequence of blocks A,B, and C in the peptide chain may be of any desired order. It  
5 should also be understood that peptide blocks A-C-B may be linked to a defined peptide sequence D, such as a naturally-occurring peptide or protein. Thus any desired molecular weight or sequence of monodisperse peptides may be utilized as the carrier  
10 moiety of the conjugate.

It should also be understood that the carrier may consist of but a single blocked amino acid residue, C, alone. Selection of the number of amino acid residues and their identity will be  
15 discussed hereinafter. Generally speaking, however, carrier moieties having molecular weights in the range of  $2 \times 10^2$  to  $10^4$  daltons seem to be most suited for maintaining the rapid onset of biological activity in vivo. Nonetheless carrier molecular  
20 weights of  $10^5$  daltons or greater are also contemplated for use in the conjugates of this invention.

Naturally-occurring monodisperse peptides are also contemplated for use as carriers for drugs  
25 in the manner already described for synthetic, monodisperse carriers. Thus, peptide hormones and proteins are useful in this context since they naturally contain functional groups (e.g. amine or carboxyl groups) provided by the side chains of  
30 their constituent amino acids. Antibodies, especially monoclonal antibodies, are particularly useful as carriers for drugs since, because of their specificity for particular cells, they can be used to target the drugs and thereby optimize the

activity of the drug while minimizing or eliminating side effects.

The spacer moiety may include an alkyl, aryl, aryl-alkyl, alkenyl, polyenyl group, so long as said group does not interfere with the coupling of the congener to the carrier. It is advantageous that the spacer group incorporate a branched chain immediately adjacent to the amine group of the drug in the case of the catecholamines, since this is known to be important for enhancing  $\beta$ -adrenergic activity. The spacer moiety must be capable of covalently bonding to the terminal end of the amine side chain of the drug; while also being capable of covalently bonding to the reactive group of the carrier molecule.

Certain drugs such as the prostaglandins can be considered to already possess a spacer group and a functional group in their naturally-occurring form, and therefore an additional spacer group may not be required for attachment to carriers.

The spacer moiety attached to the drug may be any group as noted above. The initial end of the spacer moiety must be capable of covalently bonding to the terminal end of the amine side chain of the drug; while its terminal end must be bonded to a functional group, which group must, in turn, be capable of covalent bonding to side chain Y' of the carrier amino acid residue, C. The functional group terminal end is chosen to be complementary to the functional group terminating side chain, Y' of the carrier amino acid residue, C. Thus if residue C side chain contains an amine functional grouping, e.g. lysine or p-aminophenylalanine, the terminal functional grouping of the attached functional group

may be a carboxyl, a sulfonic acid, etc.

The number of drug congeners per conjugate molecule may be one, or any number greater than one. Wherever an amino acid residue, C, is placed within 5 the carrier structure a drug congener may attached thereto. The greater the number of the C amino acid residues present in the carrier the greater the number of drug congeners that may be attached. The spacing between the drug congeners on any conjugate 10 molecule may also be controlled by the spacing of the C amino acid residues on the carrier blocks. Thus the size and sequence of the oligopeptide blocks A and B (note the variables a and b in the general structure diagram above) will determine the 15 spacings between the C peptide residues and thus the spacings between the attached drug congeners. Similarly, the sequence in which the oligopeptide blocks A,B and C are present in the carrier molecule will also determine the distances between attached 20 drug congeners.

Similarly, when naturally-occurring, monodisperse peptides are used as carriers, although the sites of attachment may remain constant, because of the defined sequence of the peptide or protein, 25 the number of drug molecules per carrier molecule may be controlled through the stoichiometry used during the coupling reaction.

The amino acid residues in the synthetic peptide carrier molecule may be present either in 30 the L-form or in the D-form, or as a mixture of both forms. Incorporation of D-amino acid residues into the carrier increases proteolytic resistance of the conjugates in vivo. Increased proteolytic resistance should also affect the duration of the

effect of the attached drug.

Generally, the conjugates of the invention are synthesized by one of two routes. The first method involves the preparation of appropriate

5 congeners wherein the extended amino side chain of the drug has a suitable spacer moiety terminated in a functional group added to the amino end of the drug. The functionalized drug i.e., the congener, is then, in turn, coupled to the side chain Y' of

10 the C amino acid residue in the carrier peptide.

The second method of synthesis involves the initial modification of the carrier peptide by coupling the spacer-functional group moiety directly to the side chain, Y', of the C amino acid residue. The

15 resulting peptide-functional group-spacer is then coupled directly to the catecholamine, for example, by a reductive amination reaction to produce the peptide-drug conjugate.

It is therefore an object of the invention  
20 to provide biologically active drug conjugates.

It is another object of the invention to provide drug conjugates that have precisely defined structures.

It is yet another object of the invention  
25 to provide catecholamine-peptide conjugates.

It is still another object of the invention to provide chemically efficient methods for producing drug conjugates.

It is still another object of the  
30 invention to provide functionalized catecholamine congeners which may be covalently bound to monodisperse peptide carriers.

Other objects and advantages of the

invention will be apparent from the description herein as well as the claims pending hereto.

Detailed Disclosure of the Invention

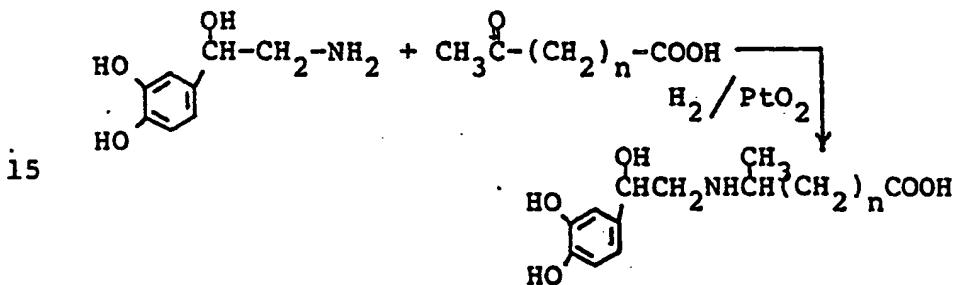
The conjugates of the invention comprise  
5 catecholamines linked to monodisperse peptide carriers through an intermediate spacer-functional group moiety. The catecholamine drug may be derived from any one of a number of bio-active catecholamines, or related adrenergic compounds such  
10 as those compounds noted above which contain suitable pharmacophores for use in the conjugate structures. It is of considerable importance that the bio-active site (pharmacophore) be stable under the conditions imposed during conjugate synthesis;  
15 and that the bio-active site be remote from the point of attachment to the spacer moiety and carrier. Previous studies have indicated that, in the case of the catecholamines, the bio-active site is closely associated with the catechol end of the  
20 molecule. Therefore, it is important that drugs be attached to the carrier at as remote a position as possible from this grouping, i.e., at the alkyl amine end of the catecholamine side chain.

It has been determined that the biological  
25 activity of the pharmacophore portion of the drug may be preserved if a spacer moiety is interposed between the drug and the carrier to which the drug is attached. Such a spacer comprises a chain structure, e.g. an alkyl grouping or branched alkyl  
30 group having from two up to five or more carbon atoms in the chain, i.e., a chain of methylene groups  $-CH_2CH_2-$ etc. ( $R=H$  or  $CH_3$  or higher alkyl). The spacer grouping also must be terminated by a

functional group which is capable of covalently linking with the side chain, Y', of the preselected amino acid on the carrier peptide. The terminating functional group may be, for instance, a carboxylic acid or a sulfonic acid, etc.

5      The drug and attached spacer comprise the congener molecule which is linked to the carrier peptide.

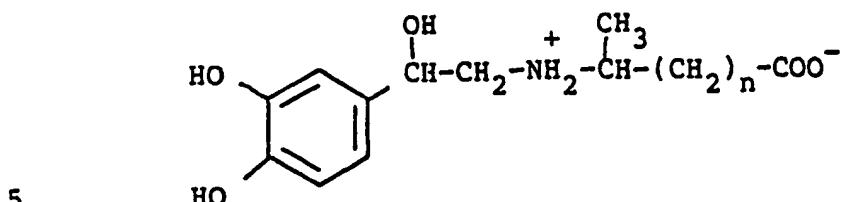
10     The congeners may be prepared from the drug by reductive amination, for example with a methyl keto-acid. For example, if the drug is norepinephrine:



20     Similarly, the other drugs described above may be derivatized in an analogous manner.

Some typical carboxyl-containing congeners prepared from norepinephrine by the above methods are set forth in Table 1 below:

Table 1.

Synthesis of Carboxylic Acid Congeners of Isoproterenol

Compound	n =	% yield <sup>b</sup>	M.W.
A	2	51	269.30
B	2 <sup>a</sup>	79	269.30
C	3	50	283.33
D	4	65	297.36
E	5	c	311.38

<sup>a</sup>prepared from D-norepinephrine;  $[\alpha]_D^{25}$  of product = 23.7°.

<sup>b</sup>prior to purification by HPLC.

15 <sup>c</sup>nearly quantitative.

A detailed description of the preparation of some catecholamine congeners and model amides is set forth in U.S. Patent Application Serial No. 184,000 filed September 4, 1980 and entitled 20 "Biologically Active Catecholamine Derivatives," which description is incorporated hereinto by reference.

The Carrier

For the purposes of the present invention, 25 monodisperse peptides which may be synthetic or

naturally occurring are most useful as the carrier portion of the drug conjugate. It is important that the amino acid sequences in the peptide carrier be completely defined and carefully controlled. As  
5 noted above for purposes of illustration, the peptide carrier may be broken down into a series of monodisperse blocks A,C,B wherein each block is linked to the others in any desired sequence. Block C consists of a single amino acid residue which is  
10 utilized as the site to which the drug congener is covalently bonded. Peptide blocks A, B are linked to block C by customary peptide linkages. However, it should be noted that blocks A,B, and C may be  
linked together in any desired sequence e.g.,  
15 A-B-C, A-C-B, B-C-A, C-A-B, etc. The sequence of naturally-occurring peptides and proteins is, of course, completely predetermined.

The drug linkage to the carrier occurs at the side chain on the amino acid unit (block C) which is incorporated into the carrier sequence for that purpose. The spacer group previously referred to links the drug and the carrier. The type of linkage to the peptide is selected on the basis of stability and potential effect on biological  
25 activity.

In the case of naturally-occurring peptides and proteins, linkage of the drug to the carrier must take advantage of functional groups provided by the side chains of the amino acids of the natural sequence. For example, carboxyl-containing congeners (Table 1) may be attached to the side chains of lysine or ornithine or to the amine terminal amine of the peptide chain.  
30

The other amino acids in the carrier are chosen to impart a particular set of physical and  
35

chemical properties to the resultant conjugate and thereby modify the drug's pharmacological properties. Each carrier molecule may have one or more congeners attached thereto. The number of drug molecules per carrier molecule may also affect the biological activity of the conjugate.

Peptide blocks A and B may be monodisperse homo-oligopeptide blocks or may be composed of several different amino acids depending upon the required overall properties of the carrier. For example, hydrophilic character can be imparted through the incorporation of glutamine, citrulline or hydroxyl-containing amino acids, e.g.  $\delta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminovaleric acid. On the other hand, hydrophobic properties are imparted through the insertion of amino acids such as alanine, valine, leucine, phenylalanine, etc. Glutamic and aspartic acids, lysine, ornithine etc. may be used to provide negatively or positively charged or zwitterionic carriers. The choice of the amino acid used at the drug binding site (block C) depends on the drug congener attached to the carrier.

In order to carefully control and fully define the amino acid sequence in the synthetic carrier peptides, the carrier molecule is built up by assembling amino acids in the desired sequence. Such peptide synthesis techniques are well known and extensively practiced. Specific examples of carrier synthesis are set forth in a number of the examples below.

During peptide synthesis a wide variety of amine and carboxyl blocking groups, X, X' may be employed. X may be a carbonyl or oxycarbonyl containing group bonded to the N-terminal amino acid residue through an amide or urethane respectively.

X' may be bonded to the C terminal residue through an amide, for instance, 3-hydroxypropylamide or N-methylamide, or through an ester linkage, for instance, a methyl, ethyl or higher alkyl ester.

5           The carrier may range in size from a single, blocked amino acid residue to much larger peptide derivatives. The peptide blocks A-B-C may be used as the carrier or they may be linked in a specific manner to similar blocks. These well-defined specific amino acid peptide sequences are 10 monodisperse sequence-controlled carrier molecules.

15           Such monodisperse peptide carriers are of primary importance to the conjugates of the invention. Through the use of monodisperse peptide carriers, the number and spacing between the drug molecules attached to the carrier can be carefully controlled. Chromatographic characterization and the chemical analysis of the conjugate molecule are also aided by monodispersity. Monodispersity of the 20 carrier molecule also aids in an analysis of the effect a change in various structures and parameters of the conjugate has upon drug activity.

#### The Conjugates

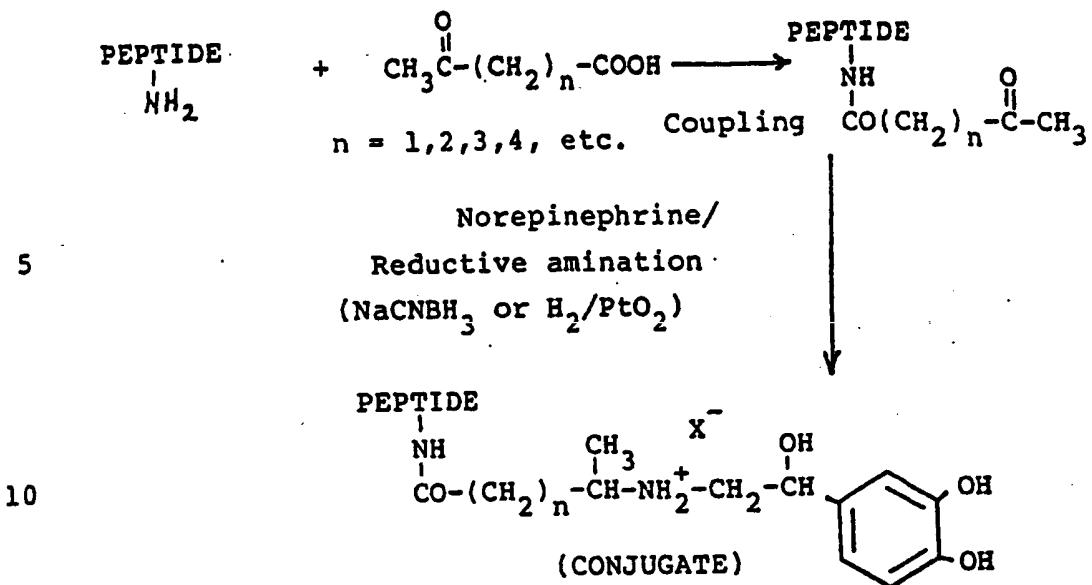
25           The structure and preparation of the conjugates may be understood by reference to a specific series of monodisperse conjugates wherein norepinephrine (the drug) is linked to monodisperse peptides (the carrier) to provide isoproterenol analogs. The synthesis of the conjugates is 30 accomplished by any of several routes wherein (1) the drug molecule is first modified to produce a congener thereof. The modification of the drug to form the congener comprises linking the desired

spacer grouping to the drug. The spacer grouping is terminated by a functional grouping which is then linked to a suitable amino acid residue on the carrier molecule; or (2) the carrier molecule has  
5 the spacer grouping linked to a predetermined amino acid residue in the carrier peptide chain and the drug molecule is then reacted with the functionalized carrier to form the desired conjugate. The second route is generally preferred  
10 in the case of small synthetic carriers because of increased yields and a decreased chance of degrading the pharmacophore portion of the drug during conjugate formation.

However, in the case of naturally-  
15 occurring peptide carriers, such as peptide hormones and proteins, the first route may be preferred because of the potential sensitivity of the carrier to degradation or decomposition (including denaturation) during the linking reaction of the  
20 drug to the prefunctionalized carrier in route (2).

The second method involves first attaching a keto-acid to the carrier peptide. The functionalized peptide carrier is then linked to the drug by reductive amination.

25 The synthesis may be illustrated schematically for the catecholamine series as:



In a variation of this method, the keto-acid  
 may first be bound to an N-protected amino acid, i.e.,  
 15      the amino acid of block C previously referred to above.  
 The functionalized amino acid is then incorporated into  
 the peptide blocks A and B, which are then reacted with  
 the catecholamine as shown above.

More specifically and for purposes of  
 20      illustration, a simple conjugate i.e.,  
 norepinephrine linked to a single amino acid (block  
 C) e.g., p-aminophenylalanine may be considered. In  
 this illustration the alpha amine and carboxylic  
 acid ends of p-aminophenylalanine are blocked by the  
 25      acetyl and 3-hydroxypropylamide groups respectively.  
 The 3-hydroxypropylamide group enhances water  
 solubility of the resultant conjugate.

In the actual procedure the amino acid p-  
 nitrophenylalanine is first converted to the N-  
 30      acetyl methyl ester derivative in two steps. One of  
 two alternate methods may be used. In the first of  
 these, esterification is carried out by the method  
 disclosed by Guttman and Boissonnas in Helv. Chim.  
 Acta. 41, 1852-1867 (1958) follow d by

pyridine-catalyzed acetylation. In the second method, the amino acid is first acetylated with acetic anhydride in cold, aqueous base without racemization by the procedure as set forth by 5 Yoshida and Ishii in J. Biol. Chem. 71, 185-191 (1972). The N-acetyl-p-nitrophenylalanine is then esterified by diazomethane.

The N-acetyl methyl ester derivative, either in the L- or D- form is then converted to the 10 3-hydroxypropylamide by aminolysis with an excess of 3-amino-1-propanol.

The methyl ketone functional grouping is attached to the acetyl amino acid hydroxypropylamide derivative by catalytic reduction of the nitro group 15 followed by coupling to a keto-acid such as 6-oxo-n-heptanoic acid. The methyl ketone functionalized amino acid carrier molecule is then subjected to catalytic reductive amination with norepinephrine in the presence of acetic acid to yield the 20 norepinephrine-amino acid conjugate. The resultant conjugate is purified by utilizing thin layer chromatography on silica gel in a polar solvent system.

Similar techniques to those outlined 25 above, may be utilized to prepare conjugates of the catecholamines with carrier molecules having multiple amino acid residues forming the peptide. Several of such preparations are set forth in the examples hereinbelow.

30 Preparation of Peptide Carriers

The following examples illustrate the various methods which may be used for producing monodisperse peptide carriers.

p-Nitro-L-Phenylalanine (1)

Using the procedure of Bergel and Stock as set forth in J. Chem. Soc., 2409-2417 (1954) L-phenylalanine (50 g) was treated with a mixture of concentrated sulfuric acid (150 ml), and fuming nitric acid (28 ml) to produce the nitro compound. Yield 26.9 g (43%) mp 232-234°<sup>C</sup>,  $[\alpha]_D^{25} = +9.6^\circ$  (c = 1.77, 1 N HCl).

p-Nitro-L-Phenylalanine Methyl Ester Hydrochloride (2)

In an adaptation of the method of Guttman and Boissonnas [Helv. Chem. Acta, 41, 1852-1867 (1958)], thionyl chloride (distilled, 0.69 ml, 9.5 mmol) was added dropwise to methanol (20 ml at -10°<sup>C</sup>). p-Nitro-L-phenylalanine (compound 1, 1.00 g, 4.76 mmol) was added, and the solution was stirred 24 hours. After evaporating to dryness the residue was recrystallized from methanol/ether giving 1.00 g (81%) of a white solid melting at 218-219°<sup>C</sup>;  $[\alpha]_D^{25} = +11.5^\circ$  (c = 0.9, H<sub>2</sub>O).

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Nitro-L-Phenylalanine Methyl Ester (3)

Compound 2 (4.10 g, 15.7 mmol) was suspended in a mixture of distilled pyridine (40 ml) and acetic anhydride (5 ml). A solution formed after several minutes, and stirring was continued overnight. The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in ethyl acetate. The solution was then extracted with 0.1 N HCl, 1 M sodium bicarbonate, and water and dried (MgSO<sub>4</sub>). Precipitation with hexanes gave 3.57 g (85.1%) of a solid melting at 113-117°<sup>C</sup>. Recrystallization from

ethyl acetate/hexanes gave 2.75 g, mp 118-120°C,  
 $[\alpha]_D^{25} = +15.1^\circ$  (c = 2.1, ethanol).

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Nitro-L-Phenylalanyl-3-Hydroxypropylamide (4)

5 Compound 3 (0.33 g, 1.2 mmol) and  
3-amino-1-propanol (1.5 ml, 20 mmol) were dissolved  
in methanol (12 ml) and stirred for 12 hours under  
 $N_2$  at room temperature. The solution was loaded  
onto a column (2x8 cm) of Dowex 50 X8 in the  
10 hydrogen form and eluted with methanol. Evaporation  
of the solvent left a light yellow solid which was  
recrystallized from ethyl acetate/hexanes. Yield  
0.29 g (75%) mp 206.5-207°C,  $[\alpha]_D^{26} = +14.8$  (c = 1.4,  
ethanol). Anal. calc. for  $C_{14}H_{19}N_3O_5$  (309.52): C,  
15 N, 54.36; H, 6.19; N, 13.58. Found: C, 54.44; H, 6.01;  
N, 13.55.

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-3-Hydroxypropylamide (5)

Compound 4 (701 mg, 2.27 mmol) was  
20 dissolved in methanol and hydrogenated overnight in  
a Parr shaker at 50 psi. with 10% palladium on  
charcoal as catalyst. Reduction was complete by TLC  
(chloroform/methanol/acetic acid: 70/25/5). The  
catalyst was removed by filtration, and the solvent  
25 was evaporated under vacuum leaving a clear, glassy  
solid. The amine was dissolved in dimethylformamide  
(30 ml). 6-Oxo-n-heptanoic acid (327 mg, 2.27 mmol)  
and dicyclohexylcarbodiimide (0.52 g, 1.1 equiv)  
were added, and the solution was stirred overnight  
30 at room temperature. After removal of

dicyclohexylurea by filtration, the solvent was evaporated in vacuo at 40°C. The residue was chromatographed on a silica gel column (3x50 cm) eluting with a stepwise gradient of 5% to 10% methanol in chloroform. Yield 207 mg (23%) of a waxy, white solid melting at 142-147°C. The melting point was raised to 157-159°C by recrystallization from methanol/ether.  $[\alpha]_D^{23} = +8.2$  (c=1.0, methanol). Anal. calc. for  $C_{21}H_{31}N_3O_5$  (405.50): C, 62.20; H, 7.71; N, 10.36. Found: C, 61.92; H, 7.98; N, 10.09.

p-Nitro-D-Phenylalanine (6)

D-Phenylalanine (12.0 g, 73 mmol) and potassium nitrate (11 g, 109 mmol) were loaded into a teflon HF apparatus commonly used for the deprotection of peptides. The mixture was treated with liquid HF at approximately 0°C for one hour. After removal of the HF by vacuum, the residue was dissolved in water and treated with concentrated ammonia until pH 6. The precipitate was recrystallized from hot water. Yield 9.31 g (61%) of a nearly white solid, mp 236.5-237°C,  $[\alpha]_D^{25} = -8.63^\circ$  (c = 1.7, 1 N HCl).

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Nitro-D-Phenylalanine (7)

Compound 6 (6.20 g) was acetylated with acetic anhydride (9 ml) in aqueous sodium hydroxide at pH 9 and 4°C according to the procedure of Yoshida and Ishii [J. Biochem., 71, 185-191 (1972)]. Obtained 5.32 g (71.4%), mp 165-166°C,  $[\alpha]_D^{25} = -46.2^\circ$  (c = 2.8, ethanol).

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Nitro-D-Phenylalanine Methyl Ester (8)

Compound 7 was dissolved in tetrahydrofuran (120 ml) and cooled in an ice bath. Diazomethane was generated by addition of 5 N-nitrosomethylurea to an ice cold, equivolume mixture of ether and 40% aqueous potassium hydroxide. The diazomethane solution was added without purification to the stirred solution of the amino acid derivative. The reaction was complete 10 when N<sub>2</sub> was no longer evolved upon addition of diazomethane. Excess diazomethane was consumed by the addition of acetic acid. The solution was extracted successively with saturated saline, 1. M sodium bicarbonate, 0.1 M HCl, and again with 15 saline and dried (MgSO<sub>4</sub>). Evaporation left 3.56 g (88.4%) of a solid melting at 110-112°C which was pure by TLC (chloroform/methanol/acetic acid: 85/10/5). [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -13.8 (c = 2.1, ethanol).

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Nitro-D-Phenylalanyl-3-Hydroxypropylamide (9)

The procedure for compound 4 was used to form the D-isomer, 9, from compound 8 (1.55 g). Yield 1.32 g (70%), mp 202.5-204°, [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = -13.8 (c = 1.1, ethanol). Anal. calc. for C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub> (309.32): 25 C, 54.36; H, 6.19; N, 13.58. Found: C, 53.93; H, 6.09; N, 13.48.

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Amino-D-Phenylalanyl-3-Hydroxypropylamide (10) and N -Acetyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-D-Phenylalanyl-3-Hydroxypropylamide (11)

5 Compound 9 (623 mg, 2.0 mmol) was hydrogenated and coupled to 6-oxo-n-heptanoic acid, by the procedure used to prepare the L-isomer 5. Column chromatography provided 11 (63.9 mg, 7.8%), by TLC with chloroform/methanol/acetic acid  
10 (50/50/5), and unreacted compound 10 (255 mg, 45% recovered). Compound 11 had mp 137-138.5°C and  $[\alpha]_D^{26} = -17.8^\circ$  (c = 1.0, ethanol).

N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-p-Nitro-L-Phenylalanine (12)

15 p-Nitro-L-phenylalanine (1) 51.3 g, 245 mmol) was stirred in ice cold sodium hydroxide (1 N, 245 ml). Dioxane (400 ml) and di-t-butyl-dicarbonate (Fluka, 60.0 g, 275 mmol) were added. After stirring overnight in the cold, the dioxane was evaporated in vacuo. The mixture was cooled,  
20 acidified to pH 2 with sodium bisulfate (1 N), and extracted with ethyl acetate (3X). The combined extracts were washed with water, dried ( $MgSO_4$ ), and evaporated. Recrystallization from ethyl acetate/hexanes gave 60.7 g (80.2%) of compound 12  
25 mp 105-107°C,  $[\alpha]_D^{26} = +25.4$  (c = 1.1, 1 M sodium bicarbonate).

N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-p-Nitro-L-Phenylalanyl-Glycine Benzyl Ester (13)

30 The carboxylic acid component (12, 10.0 g, 32.2 mmol) was dissolved in dry

tetrahydrofuran (100 ml) in a 250 ml round-bottom flask equipped with a drying tube. N-methylmorpholine (3.54 ml, 1 equivalent) was added, and the solution was cooled to -15°C in a bath of dry ice/isopropanol. Isobutyl chloroformate (4.18 ml, 1 equivalent) was added slowly to the stirred solution. The flask was allowed to warm to room temperature to insure complete formation of the mixed anhydride. A solution of glycine benzyl ester p-toluenesulfonate (Bachem, 10.9 g, 32.2 mmol) in dry tetrahydrofuran (100 ml) was cooled to -15°C, and treated with one equivalent of N-methylmorpholine. The flask containing the mixed anhydride was again cooled to -15°, and to it was added the glycine derivative. The mixture was allowed to reach room temperature and stirred for an hour or more. The solvent was then evaporated, and the residue was suspended in ethyl acetate. The mixture was then washed successively with HCl (0.1 N), saturated sodium bicarbonate, and water. After drying ( $MgSO_4$ ) and filtering, the solution was evaporated to dryness. The solid residue was recrystallized from chloroform/hexanes. Yield 12.14 g (82.4%), mp 115-118.5°C,  $[\alpha]_D^{25} = -7.90^\circ$  (c = 1.8, chloroform). Anal. calc. for  $C_{23}H_{27}N_3O_7$  (457.45): C, 60.39; H, 5.95; N, 9.19. Found: C, 60.42; H, 6.07; N, 9.11.

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Nitro-L-Phenylalanyl-Glycine Benzyl Ester (14)

The dipeptide (13, 1.73 g, 3.78 mmol) was dissolved in dry methylene chloride (5 ml) in a 25 ml round-bottom flask equipped with a drying tube.

The flask was cooled in an ice bath. Anhydrous trifluoroacetic acid (Aldrich, 5 ml) was added, and the solution was stirred at room temperature. After one hour the solvent was evaporated under reduced pressure leaving an oil. Successive addition of ether followed by either evaporation or decantation caused the residue to solidify. It was then placed under high vacuum to remove traces of trifluoroacetic acid.

10 The trifluoroacetate salt was dissolved in a mixture of dry tetrahydrofuran (10 ml) and distilled pyridine (2 ml). The solution was ascertained not to be strongly or moderately acidic and then treated with acetic anhydride (0.50 ml, 15 5.3 mmol). Product precipitated while the reaction continued overnight. Dry ether was added to complete the precipitation. The product was collected by vacuum filtration and washed thoroughly with ether. Yield 1.36 g (90%), recrystallized from 20 acetone to give mp 180.5-181°C,  $[\alpha]_D^{26} = -3.9^\circ$  (c = 1.1, dioxane).

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-Amino-L-Phenylalanyl-Glycine Benzyl Ester (15)

Compound 14 (267 mg, 0.67 mmol) was 25 dissolved in methanol (50 ml). Platinum dioxide (3% of weight of peptide) was added, and the mixture was hydrogenated at atmospheric pressure. After 4 hours TLC (chloroform/methanol/acetic acid: 85/10/5) showed a clean conversion to the amine. The 30 catalyst was separated by decantation, and the solvent was removed under reduced pressure. Compound 15 was obtained in nearly quantitative yield as a glassy solid.

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide (16)

Compound 15 (0.31 g, 0.63 mmol) was dissolved in a minimal amount of methanol (75 ml) by warming and the solution then cooled in an ice bath. Methylamine gas (Matheson) was passed through a sodium hydroxide drying tube into the solution. When saturation by the gas was approached (considerable gain in volume) the flask was stoppered and stored overnight at room temperature. Evaporation left a clear oil, which was redissolved in methanol. A precipitate was formed through the addition of chloroform and dry ether. The product was collected on a fine glass filter. Residual methylamine as detected by TLC (chloroform/methanol/acetic acid: 50/50/5) could not be removed in vacuo, but only by reprecipitation. Yield 180 mg (69%), mp 201-203°<sup>C</sup>,  $[\alpha]_D^{26} = +31.9^{\circ}$ . Anal. Calc. for C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub>.H<sub>2</sub>O: C, 57.78; H, 7.39; N, 12.84. Found C, 57.55; H, 7.06; N, 12.91.

N<sup>α</sup>-Acetyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-Glycine Benzyl Ester (17)

The mixed anhydride coupling was performed as described for the synthesis of compound 13 with 6-oxo-n-heptanoic acid (97 mg, 0.67 mmol) and the product from above, compound 15 (238 mg, 0.67 mmol). Each component was dissolved in 10 ml of dry tetrahydrofuran. Yield 111 mg (34%), mp 177.5-180.5°<sup>C</sup>,  $[\alpha]_D^{25} = +19.5$  (c = 1.4, methanol). Anal. calc. for C<sub>27</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub> (493.58): C, 65.44; H, 6.71; N, 8.48. Found: C, 65.46; H, 6.74; N, 8.61.

N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-p-Nitro-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide (18)

Compound 13 (7.73 g, 16.9 mmol) in methanol (350 ml) was treated with methylamine as described for the synthesis of compound 16. The solvent was evaporated from the reaction mixture leaving a yellow solid, which was recrystallized from chloroform/hexanes. Yield 6.04 g (94.0%), mp 182-184°C,  $[\alpha]_D^{25} = +6.0^\circ$  (c = 1.0, methanol).

Anal. calc. for  $C_{17}H_{24}N_4O_6$  (380.40): C, 53.86; H, 6.36; N, 14.73. Found: C, 53.73; H, 6.45; N, 14.72.

N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide (19)

Compound 18 (5.28 g, 13.9 mmol) was dissolved in methanol (150 ml) and hydrogenated overnight at 1 - 3 Atm. using 10% palladium on charcoal catalyst (10% of weight of peptide). The catalyst was removed by filtration through Celite.

The solvent was evaporated leaving a glassy solid, which was used without further purification.

6-Oxo-n-heptanoic acid (2.00 g, 13.9 mmol) was coupled by the mixed anhydride procedure as described for compound 13. Yield 5.87 g (89%) of a clear glass, which was homogeneous by TLC (chloroform/methanol/acetic acid: (85/10/5)).  $[\alpha]_D^{26} = +23.8^\circ$  (c = 1.2, methanol).

N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-γ-Benzyl-L-Glutamyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide  
(20)

Compound 19 (570 mg, 1.2 mmol) was  
5 deprotected as described for the synthesis of  
compound 14. The amine trifluoroacetate salt was  
dissolved in dry tetrahydrofuran (11 ml) and  
neutralized with N-methylmorpholine. Then  
N<sup>α</sup>-t-butyloxycarbonyl-γ-benzyl-L-glutamic acid  
10 (Bachem, 408 mg, 1.2 mmol) and  
dicyclohexylcarbodiimide (0.3 g, 1.5 mmol) were  
added. After stirring overnight the mixture was  
filtered and the solvent was evaporated. The  
residue was redissolved in chloroform and washed  
15 with 0.1 N HCl, satd. sodium bicarbonate, and satd.  
sodium chloride. The organic phase was dried over  
magnesium sulfate, filtered, and evaporated. The  
residue was recrystallized from chloroform/hexanes.  
Yield 538 mg (66%), mp 114.5-118°C,  
20 [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = -17.8 (c = 1.1, methanol). Anal. calc. for  
C<sub>36</sub>H<sub>49</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>.1/2H<sub>2</sub>O: C, 61.35; H, 7.15; N, 9.94.  
Found: C, 61.53; H, 6.95; N, 9.97.

N<sup>α</sup>-Acetyl-γ-Benzyl-L-Glutamyl-p-(6-Oxo-n-Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide  
(21)

Compound 20 (444 mg, 0.638 mmol) was  
deprotected with trifluoroacetic acid in methylene  
chloride (10 ml, each) according to the procedure  
for compound 14. The amine trifluoroacetate salt  
30 was dissolved in a mixture of tetrahydrofuran (20  
ml) and distilled pyridine (2.0 ml). Acetic

anhydride (0.25 ml, 2.6 mmol) was added. After stirring for three hours the precipitate was collected on a fine glass filter and washed with tetrahydrofuran. Yield 361 mg (89%) of a white solid melting at 187-190°C, which was pure by TLC (chloroform/methanol/acetic acid: 70/25/5).  
5 [α]<sub>D</sub><sup>26</sup> = -6.1° (c = 1.0, DMSO).

10 N<sup>α</sup>-Acetyl-N'-Methyl-L-Glutamyl-p-(6-Oxo-n-

Heptanoylamino)-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide

(22)

15 Compound 21 (122 mg, 0.19 mmol) was treated with methylamine in methanol (50ml) according to the procedure for compound 16. Yield 86 mg (80%), mp 210-214°C, [α]<sub>D</sub><sup>25</sup> = -22.5° (c = 1.3,  
H<sub>2</sub>O). Anal. calc. for C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>N<sub>6</sub>O<sub>8</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 56.04;

H, 7.32; N, 14.52. Found: C, 56.21; H, 7.28;

N, 14.30.

20 Similar techniques to those illustrated above can be utilized to prepare any desired monodisperse peptide carrier for use in preparing the conjugates of the invention.

Preparation of Conjugates:

25 The following examples illustrate the general methods used for the preparation of conjugates. The carriers were monodisperse peptides and the drug was norepinephrine:

N<sup>α</sup>-t-Butyloxycarbonyl-p-[6-(β-3',4'-Dihydroxyphenyl-β-Hydroxy)-Ethylamino-n-Heptanoylamino]-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide (23)

Method A

The peptide derivative 19 (239 mg, 0.50 mmol) and DL-norepinephrine (85 mg, 0.50 mmol) were dissolved in acetic acid (2 ml) and hydrogenated for 5 two days at atmospheric pressure and room temperature over platinum dioxide catalyst (2 - 20% of weight of peptide). The solution was decanted from the catalyst and added to cold dilute hydrochloric acid (0.01 N, 50 ml). Extractions with 10 chloroform and then with n-butanol were performed. The combined butanol extracts were washed with saline until neutral and evaporated under vacuum at less than 40°C. The residue was extracted with n-butanol (3x), filtered, and evaporated. The 15 resulting oil was solidified by trituration with ether giving 230 mg of the hydrochloride salt of the title compound. This was then purified by HPLC. Yield 49% of the dihydrogen phosphate salt.

Method B

Compound 19 (2.56 g, 5.4 mmol) and 20 DL-norepinephrine hydrochloride (1.19 g, 5.8 mmol) were dissolved in methanol (100 ml) containing acetic acid (0.5 ml). Sodium cyanoborohydride (0.46 g, 7.3 mmol) in methanol (20 ml) was added 25 dropwise, and the solution was heated at 40°C for 20 hours. Hydrochloric acid (0.1 N, 200 ml) was added at 10°C, and the solution was degassed under suction from a water aspirator. The solution was extracted with chloroform (3x). Concentrated sodium chloride 30 was added and the product was extracted with n-butanol as described in Method A. The residue was purified by flash chromatography (55 X 150 mm column, eluting with a gradient of 4 to 15 parts methanol in 50

parts chloroform and 5 parts acetic acid). The eluate was reduced to one-tenth the original volume in vacuo and added to cold 0.1 N HCl. The product was extracted and solidified as described in Method

- 5 A giving 1.46 g (41%) of the hydrochloride salt of the title compound.  $[\alpha]_D^{26} = +6.2^\circ$  ( $c = 1.5, H_2O$ ). Anal. calc. for  $C_{32}H_{48}N_5O_8Cl \cdot 2/3BuOH \cdot 4/3H_2O$ : C, 56.29; H, 7.81; N, 9.47. Found: C, 56.28; H, 7.86; N, 9.41.

- 10  $N^{\alpha}$ -Acetyl-p-[6-( $\beta$ -3',4-Dihydroxyphenyl- $\beta$ -Hydroxy)-Ethylamino-n-Heptanoylamino]-L-Phenylalanyl-Glycyl-Methylamide (24)

Method C

- The peptide derivative 16 (24 mg, 57 mol) 15 and DL-norepinephrine (9.7 mg, 57  $\mu$ mol) were hydrogenated as described in Method A. The reaction mixture was chromatographed on preparative TLC (silica, chloroform/methanol/acetic acid: 50/50/5). The product was identified on the plate by slight 20 darkening due to oxidation, and by ultraviolet detection. The band was extracted with methanol, and the product was purified by HPLC. Yield 6.4 mg (17%) of the dihydrogen phosphate salt of the title compound.

- 25  $N^{\alpha}$ -Acetyl-N'-Methyl-L-Glutaminyl-p-[6-( $\beta$ -3',4'-Dihydroxyphenyl- $\beta$ -Hydroxy)-Ethylamino-n-Heptanoylamino]-L-Phenylalanyl-N'-Methyl-L-Glutaminyl-Methylamide (25)

Method D

- 30 The tripeptide derivative,  $N^{\alpha}$ -acetyl-N'-methyl-L-glutaminyl-p-(6-oxo-n-heptanoylamino)-L-

phenylalanyl-N'-methyl-L-glutaminyl-methylamide (55 mg, 85  $\mu$ mol) and DL-norepinephrine hydrochloride (35 mg, 170  $\mu$ mol) were dissolved in pH 5 sodium acetate buffer (0.2M, 6 ml). Sodium

- 5 cyanoborohydride (38 mg, 0.60 mmol) in methanol (6 ml) was added, and the mixture was heated at 60°C for 48 hours. Most of the solvent was then removed by evaporation, and hydrochloric acid (0.2 N, 5 ml) was added. The mixture was filtered and applied to  
10 a Bio-gel P-2 column (1.6 x 75 cm) in the cold. The material was eluted with 0.01 N HCl. The salt of the title compound (4 mg, 6%) eluted at 0.161V<sub>t</sub>. The proton NMR spectrum of the product was identical to that of the same compound synthesized by Method  
15 C.

N'-t-Butyloxycarbonyl-tri- $\delta$ -Hydroxy-L- $\alpha$ -Aminovaleryl-p-[6- $\beta$ -3',4'-Dihydroxyphenyl- $\beta$ -Hydroxy)-Ethylamino-n-Heptanoylamino]-L-Phenylalanyl-Glycyl Methylamide  
(26)

20 Method E

- DL-norepinephrine.HCl (9.5 mg, 46 mol) containing <sup>14</sup>C-labeled tracer and a pentapeptide derivative N'-t-butyloxycarbonyl-tri-( $\delta$ -hydroxy-L- $\alpha$ -aminovaleryl)-p-(6-oxo-n-heptanoylamino)-L-  
25 phenylalanyl-glycyl-methylamide (19.2 mg, 23  $\mu$ mol) were dissolved in a mixture of methanol (4.5 ml) and 0.2 N sodium acetate (pH 5) buffer. The solution was evaporated to a small volume, and n-butanol (3 ml) was added. Half of the volume of solvent  
30 then was removed in vacuo at 40°C. A solution of sodium cyanoborohydride (14 mg, 0.22 mol) in methanol (1 ml) was added, and the solution was

warmed at 50°C for 48 hours. The precipitate was removed by centrifugation and the product was isolated by reversed phase HPLC. Yield 10 mg (40%) of the dihydrogen phosphate salt of the title  
5 compound. The specific activity of the product was within 3% of that measured for the starting material.

Biological Activity - in vitro

The biological activity of the conjugates of the invention was tested in a wild type S49 cell assay. The assay is indicative of the relative beta adrenergic activity of the compound. The activity of each conjugate tested was compared to the activity of isoproterenol as the base standard.  
10

In the test, S49 cells were centrifuged  
15 and then resuspended (2 to  $2.5 \times 10^6$  cells per ml.) in Dulbecco's modified Eagle medium (13.3 g per liter) and 20mM Hepes (pH 7.4) + 0.1% bovine serum albumin. The S49 suspensions were incubated at 37°C for 10 minutes without the conjugate and then added to  
20 tubes with or without the conjugate for an additional 6 minutes. The reaction was stopped by cooling on ice. Incubation without the conjugates present established a base line.

After isolation of a pellet of cells by  
25 centrifugation they were resuspended and boiled. Aliquots were then used for the competitive binding assay for cyclic AMP described by Gilman in the Proceedings of the National Academy of Sciences USA  
67, 305-312 (1970). Results were plotted as pmol  
30 cyclic AMP accumulated per  $10^7$  cells in excess of base line as a function of the log of the concentration of the analog.

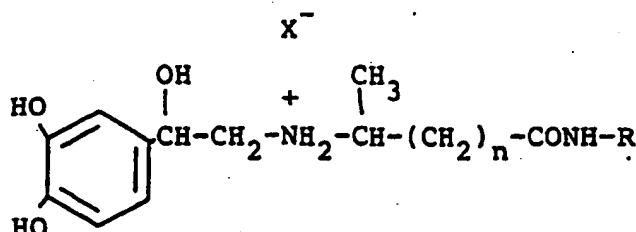
The results in vitro testing of some typical conjugate compounds is set forth in Table 2 below:

Table 2.

5

In Vitro Biological Activity<sup>a</sup> of Peptide Conjugates of Isoproterenol.

10



15

$\text{X} = \text{Cl}, \text{H}_2\text{PO}_4^-, \text{OAc}$

	compound	$\text{R}^b$	n	Activity relative to isoproterenol	
					$^{-2}$
15	A	Ac-L-Phe-HPA	4	9.0x10	<sup>-2</sup>
	B	Ac-D-Phe-HPA	4	4.0x10	<sup>-1</sup>
	C	Ac-Phe-Gly-OH	4	4.4x10	<sup>-1</sup>
	D	Ac-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	1.1	
	E	Boc-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	4.1	
20	F	H-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	1.3x10	<sup>-4</sup>
	G	Boc-Gly-Phe-NHCH <sub>3</sub>	4	6.8x10	<sup>-1</sup>
	H	Ac-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	3.7x10	<sup>-6</sup>
	I	Ac-Hyv-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	8.0x10	<sup>-5</sup>
	J	Ac-Cit-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	5.5x10	<sup>-2</sup>
25	K	Boc-Cit-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	3.8x10	<sup>-5</sup>
	L	Ac-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Phe-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	4.5x10	<sup>-6</sup>
	M	Ac-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Phe-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4	2.3x10	<sup>-5</sup>
	N	Ac-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Phe-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5	8.6x10	<sup>-6</sup>
	O	Boc-Hyv <sub>3</sub> -Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	1.0	
30	P	Boc-Phe-Hyv <sub>3</sub> -Gly-NHCH <sub>3</sub>	4	7.9x10	<sup>-1</sup>

<sup>a</sup>Biological activity was measured by cyclic AMP accumulation in S49 cells. Relative activity is expressed as the ratio of  $K_A$  for isoproterenol to  $K_A$  for the compound.

5      <sup>b</sup>Abbreviations used: Ac = acetyl; Phe = phenylalanine; HPA = hydroxypropylamide; Gly = glycine; Boc = t-butyloxycarbonyl; Glu = glutamic acid; Hyv =  $\beta$ -hydroxy- $\alpha$ -aminovaleric acid; Cit = citrulline

10      Biological Activity - in vivo

In addition to the in vitro testing set forth above, in vivo testing was also conducted on a number of conjugates of the invention. The tests were conducted by injecting various doses of the 15 test conjugate into the femoral vein of rats and thereafter recording changes in heart rate, arterial pulse pressure and mean pressure.

More specifically, male Sprague-Dawley rats weighing 280-350 g had their femoral arteries 20 connected to a Statham P-23 pressure transducer, which was in turn recorded on a Beckman Dynograph model R511A. Venus cannula were inserted in the femoral veins. Two syringes were attached to the veins via a 3-way stopcock. One syringe contained 25 heparinized saline (40 units/ml) while the other contained the conjugate to be tested.

All cannulas were periodically flushed with the heparinized saline to prevent clots from forming. After the blood pressure and heart rate 30 had stabilized, a volume of heparinized saline corresponding to the volume of drug conjugate the animal was to receive, was injected, and the response observed. Then various doses of the test

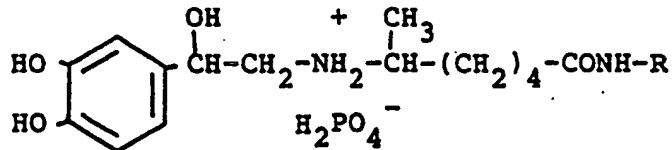
drug conjugate were injected with a minimum interval of ten minutes between doses. The dose range was from 0.001 to 10.0 mg/kg, with the doses always being administered in increasing amounts.

From the drug injections, a dose-response curve was obtained. The response curves were then compared to the animals' response to isoproterenol administered under the same conditions. Table 3 below presents the results of these in vivo tests:

10

Table 3.

In Vivo Activity of Peptide Conjugates of Isoproterenol



15

Compound	R	In Vivo Activity <sup>a</sup> Relative to Isoproterenol
E	Boc-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	3.74
G	Boc-Gly-Phe-NHCH <sub>3</sub>	.92
H	Ac-Glu(NHCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> -Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	1.77
I	Ac-Hyv-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	1.48
J	Ac-Cit-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	.79
K	Boc-Cit-Phe-Gly-NHCH <sub>3</sub>	.22
O	Boc-Hyv <sub>3</sub> -Phe-Cly-NHCH <sub>3</sub>	.76
P	Boc-Phe-Hyv <sub>3</sub> -Gly-NHCH <sub>3</sub>	.59

25

0094844

-46-

<sup>a</sup>Biological activity in vivo was measured as the effective dose that reduces rat blood pressure by 50%. Relative activity is expressed as the ratio of the molar ED<sub>50</sub> of isoproterenol to the molar ED<sub>50</sub> of 5 the compound.

- 47 -

Claims

1. A conjugate molecular composition comprising a carrier moiety and at least one drug molecule moiety containing a pharmacophore, each drug molecule moiety being covalently linked to the carrier moiety via a spacer grouping, the spacer grouping being linked to the carrier by reacted functional groups and to the drug molecule moiety by covalent attachment at a position on the drug molecule moiety remote from the pharmacophore.
2. A composition as claimed in claim 1 wherein said drug molecule moiety is a catecholamine, a beta-adrenergic drug, a sympathomimetic drug or an autacoid.
3. A composition as claimed in claim 1 or claim 2 wherein two or more drug molecule moieties are covalently linked to said carrier moiety.
4. A composition as claimed in any one of the preceding claims wherein the spacer grouping includes an alkyl chain.
5. A composition as claimed in claim 4 wherein the alkyl chain is a branched methylene chain containing 2-6 methylene groups.
6. A composition as claimed in claim 4 or claim 5 wherein said spacer grouping has an amide group attached thereto intermediate said alkyl chain and said carrier.
7. A composition as claimed in any one of claims 1 to 3 wherein the spacer grouping is a branched chain organic grouping one end of which is covalently linked to said drug molecule moiety and the other end of which is covalently linked to a functional group and the reacted functional group is covalently linked to said carrier.
8. A composition as claimed in any one of the preceding

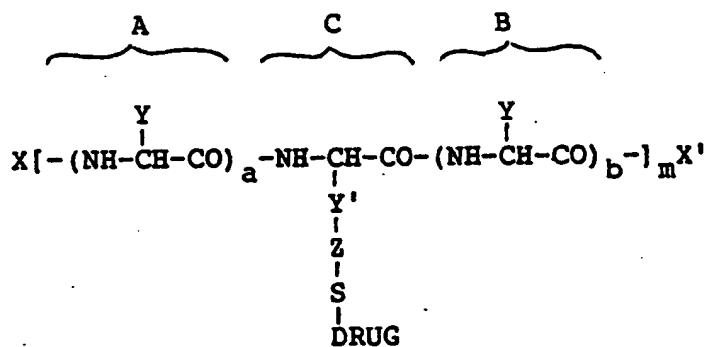
claims wherein the carrier moiety is a natural or synthetic peptide or protein, or a monoclonal antibody.

9. A composition as claimed in claim 8, wherein the carrier moiety is a peptide and an amino acid residue in said peptide is covalently linked to said spacer grouping via the reacted functional groups.

10. A composition as claimed in claim 8 or claim 9 wherein the carrier moiety is a monodisperse peptide.

11. A composition as claimed in any one of the preceding claims wherein the carrier moiety is a peptide whose amine and carboxyl ends are protected.

12. A composition as claimed in claim 1 having the general formula:



where:

A and B are oligopeptide blocks wherein the amino acid residues are the same, or preselected sequences of amino acid residues;

C is an amino acid residue functionalized for attachment to the drug molecule moiety ("DRUG");

S is a spacer grouping connecting the drug to reacted functional groups, Z, and wherein the spacer grouping includes a branched alkyl chain and wherein one end of said spacer grouping

is covalently bound to the drug and the other end is covalently bound to said reacted functional groups and from thence to a side chain forming a portion, -Y', of amino acid residue C;

X is an amine-blocking group, or a hydrogen atom;

X' is a carboxyl-blocking group, or a hydrogen atom;

Y is an amino acid residue side chain;  
a and b, which may be the same or different,  
represent zero or an integer; and m is an  
integer.

13. A composition as claimed in claim 12 wherein the blocks A and B and the amino acid residue, C, comprise a monodisperse peptide carrier for said drug, or wherein the peptide blocks comprise a protein, a monoclonal antibody or a naturally-occurring peptide.
14. A composition as claimed in claim 12 wherein the peptide sequence of the carrier is:

Ac-L-Phe-HPA

Ac-D-Phe-HPA

Ac-Phe-Gly-OH

Ac-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

Boc-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

H-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

Boc-Gly-Phe-NHCH<sub>3</sub>

Ac-Glu(NHCH<sub>3</sub>) -Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

Ac-Hyv-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

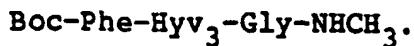
Ac-Cit-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

Boc-Cit-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

Ac-Glu(NHCH<sub>3</sub>) -Phe-Glu-(NHCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

Boc-Hyv<sub>3</sub>-Phe-Gly-NHCH<sub>3</sub>

or



15. A method for producing a composition as claimed in any one of the preceding claims comprising reacting at least one drug containing a pharmacophore with a functionalized spacer moiety to produce a drug congener in which said spacer moiety is linked to said drug at a position remote from the pharmacophore and reacting said congener with a carrier to link said congener covalently to said carrier via said functionalized spacer moiety.
16. A method as claimed in claim 15 wherein the drug is a catecholamine and the spacer moiety is linked to the amine containing grouping of said catecholamine.
17. A method for producing a composition as claimed in claim 10, comprising synthesizing a monodisperse peptide, linking a functionalized spacer moiety to at least one preselected amino acid residue on said peptide, and then reacting said peptide and its attached spacer moiety with a drug molecule to link said spacer moiety and thereby said peptide covalently to said drug to form said composition.
18. A method as claimed in claim 17 wherein the drug is a catecholamine and is linked to said spacer moiety and the peptide at the amine end thereof.
19. A method as claimed in claim 18 wherein the catecholamine is linked to said spacer moiety and peptide by a reductive amination reaction.